

Dissertation

**Wechselwirkungen der intestinalen Mikroflora
und des angeborenen Immunsystems
bei entzündlichen Erkrankungen im
Gastrointestinaltrakt**

Zur Erlangung des akademischen Grades
doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.)
im Fach Biologie

eingereicht an der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät I
der Humboldt-Universität zu Berlin

Von
Diplom-Biologe
André Fischer
geboren am 23.07.1970 in Berlin

Präsident der Humboldt-Universität zu Berlin
Prof. Dr. Christoph Marksches
Dekan der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät I
Prof. Dr. Christian Limberg

Gutachter: 1. Prof. Dr. Hannelore Hoch
2. Prof. Dr. Dr. Ulf B. Göbel
3. Prof. Dr. Michael Blaut

eingereicht: 07.03.2007

Datum der Promotion: 06.07.2007

ZUSAMMENFASSUNG.....	6
1 EINLEITUNG.....	7
1.1 Chronisch-entzündliche Darmerkrankungen beim Menschen.....	7
1.2 Die Rolle der Darmflora bei chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen	10
1.3 Tiermodelle für Darmentzündung (Ileitis und Colitis)	15
1.4 Auswirkungen einer <i>H. pylori</i> -Infektion auf die Magenflora und Vakzinierungsmodelle gegen <i>H. pylori</i> bei Tier und Mensch	16
1.5 Molekulargenetische Analyse der mikrobiellen Diversität in komplexen Habitaten.....	18
1.6 Fragestellungen	20
2 MATERIAL UND METHODEN	22
2.1 Material.....	22
2.1.1 Chemikalien und Reagenzien	22
2.1.2 Geräte, kommerzielle „Kits“ und andere Materialien	23
2.1.3 Puffer und Lösungen	25
2.1.4 Oligonukleotidprimer und -sonden	26
2.1.5 DNA-Längenmarker, Enzyme, Plasmide, Zellen.....	28
2.1.6 Mausstämme	28
2.1.7 Nährmedien und biochemische Leistungsprüfung.....	29
2.2 Versuchstiere	30
2.2.1 Mausstämme und Genotypisierungen	30
2.2.2 Haltungsbedingungen.....	30
2.3 Tierversuche	31
2.3.1 Induktion einer Ileitis durch orale <i>T. gondii</i> -Infektion	31
2.3.2 Induktion der Colitis mit DSS	31
2.3.3 <i>Salmonella enterica</i> als orale Lebendvakzine gegen <i>H. pylori</i>	31
2.3.4 Übersicht zum Ablauf der Probennahme bei Ileitis und Colitis	32
2.3.5 Beurteilung von Histopathologie in Ileum und Colon	33
2.3.6 Beurteilung der Parasitenlast	34
2.3.7 Kulturelle Analyse der Bakterienflora	34

2.3.8	Antibiotische Behandlung der Ileitis	34
2.3.9	Herstellung gnotobiotischer Mäuse, definierte Rekolonisierung und Gabe von <i>E. coli</i> Lipid A.....	35
2.3.10	Statistik	36
2.4	DNA-Isolierung und Polymerasekettenreaktion	37
2.4.1	Isolierung von DNA.....	37
2.4.2	Amplifikation der bakteriellen 16S rRNA-Gene.....	38
2.4.3	Klonierung der amplifizierten 16S rRNA	38
2.4.4	Isolierung der bakteriellen Plasmid-DNA.....	39
2.4.5	Reinigung und Überprüfung der PCR-Produkte	39
2.5	Denaturierende Gradienten-Gel-Elektrophorese	40
2.5.1	Herstellung der Gele für die DGGE	41
2.5.2	Färbung von DNA	41
2.5.3	DGGE-Bandenisolierung und direkte Sequenzierung.....	41
2.6	DNA Sequenzierung	42
2.6.1	Identifizierung von Bakterienisolaten	42
2.6.2	Sequenzanalyse von 16S rRNA-Genbibliotheken	42
2.6.3	Phylogenetische Einordnung der bakteriellen 16S rRNA-Sequenzen	43
2.7	Identifikation von 16S rRNA-Genen in Klonbibliotheken durch Hybridisierung.....	43
2.8	Quantitative Echtzeit-PCR der <i>Lactobacillus</i>-16S rRNA	45
2.9	Typisierung von <i>E. coli</i>	46
2.9.1	Typisierung von Bakterienisolaten mittels RAPD-PCR.....	46
2.9.2	Pathotypisierung.....	46
2.10	Analysen der RNA-Expression durch Hybridisierung von Microarrays	46
2.11	Konzentrationsmessung von Immunmediatoren	47
3	ERGEBNISSE	49
3.1	Analyse der Darmflora bei <i>T. gondii</i>-induzierter Ileitis.....	49
3.1.1	Analyse der kultivierbaren planktonischen Ileumflora	49
3.1.2	Histopathologie und Populationsdynamik der Ileitis.....	50
3.1.3	Molekulargenetische Analyse der Darmflora	52
3.1.3.1	PCR-DGGE	52

3.1.3.2 16S rRNA Klonbibliotheken	54
3.1.3.3 Typisierung von <i>E. coli</i>	55
3.1.3.3.1 RAPD-PCR	55
3.1.3.3.2 Pathotypisierung	56
3.1.4 Behandlung der Ileitis mit Antibiotika	58
3.1.4.1 Prophylaktische Behandlung mit Ciprofloxacin / Metronidazol	58
3.1.4.2 Behandlung einer bestehenden Ileitis mit Ciprofloxacin/Metronidazol	60
3.1.5 Gnotobiotische C57BL/6-Tiere und definierte Rekolonisierung	62
3.2 Einfluss von TLR-Defizienz auf die Darmflora bei <i>T. gondii</i>-induzierter Ileitis.....	65
3.2.1 Analyse der kultivierbaren Darmflora TLR-defizienter Tiere	65
3.2.2 PCR-DGGE der Darmflora TLR-defizienter Tiere	67
3.2.3 Überleben, Histopathologie und Immunantwort bei TLR-defizienten Tieren	67
3.2.4 Einfluss von definierter Rekolonisierung und TLR-Liganden bei gnotobiotischen TLR4-defizienten Mäusen mit <i>T. gondii</i> -induzierter Ileitis	70
3.2.4.1 <i>E. coli</i> -Monokolonisierung von TLR-defizienten gnotobiotischen Tieren mit <i>T. gondii</i> -Ileitis.....	70
3.2.4.2 Gabe von <i>E. coli</i> Lipid A bei TLR4-defizienten Tieren mit <i>T. gondii</i> -Ileitis.....	70
3.2.5 Behandlung von <i>T. gondii</i> -infizierten C57BL/6 Tieren mit Polymyxin B	72
3.2.6 RNA-Expressionsanalyse bei TLR-defizienten Tieren mit <i>T. gondii</i> -Ileitis	74
3.3 DSS-Colitis bei TLR-defizienten Tieren	80
3.3.1 Analyse der kultivierbaren Colonflora bei TLR-defizienten Tieren	80
3.3.2 Schweregrad der DSS-Colitis bei TLR-defizienten Tieren	81
3.3.3 Molekulare Charakterisierung der Colonflora in TLR-defizienten Mäusen mit DSS-Colitis	83
3.3.4 Entwicklung einer komplexen Colonflora bei TLR-defizienten Tieren.....	85
3.4 Veränderungen der Mausemaginaflora bei <i>H. pylori</i>-Infektion.....	87
3.4.1 Analyse der bakteriellen Diversität im Mausemagin bei <i>H. pylori</i> -Infektion	87
3.4.2 Einfluss einer <i>Salmonella</i> -Lebendvaccine auf die <i>H. pylori</i> -induzierten Änderungen der Maginaflora	87

4 DISKUSSION	92
4.1 Die <i>T. gondii</i>-induzierte Ileitis als Darmentzündungsmodell	92
4.1.1 Eigenschaften und Vorzüge des Modells	92
4.1.2 Der Einfluss von Bakterien im <i>T. gondii</i> -induzierten Ileitis-Modell.....	95
4.2 Die spezielle Bedeutung von Toll-Like Rezeptoren bei beiden Darmentzündungsmodellen.....	98
4.3 Die DSS-Colitis als Darmentzündungsmodell.....	103
4.4 Der Einfluss einer <i>Salmonella</i>-Lebendvakzine auf <i>H. pylori</i>-induzierte Änderungen der Mausemaginaflora.....	106
LITERATURVERZEICHNIS.....	109
ANHANG	137
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....	145
PUBLIKATIONSLISTE	147
DANKSAGUNG	149

Zusammenfassung

Die chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen Morbus Crohn und Colitis ulcerosa sind wiederkehrende, nicht heilbare, immunvermittelte Krankheiten unklarer Ursache. Genetische Prädisposition und Umweltfaktoren können die Barrierefunktion der Darmmukosa stören, so dass eine überschüssige Entzündungsreaktion folgt, die durch kommensale Bakterien der normalen Darmflora verstärkt wird. Die Infektion mit *H. pylori* im Magen kann zu Gastritis, Ulkuskrankheit und der Entstehung von MALT-Lymphomen und Magenkarzinomen führen. An der Erkennung von bakteriellen Bestandteilen im Gastrointestinaltrakt sind Toll-like-Rezeptoren (TLR), als Komponenten des angeborenen Immunsystems maßgeblich beteiligt. In der vorliegenden Arbeit wurden Veränderungen der Bakterienflora bei Ileitis, Colitis und bei Vorliegen einer *H. pylori*-Infektion im Mausmodell untersucht. Durch eine globale Florenanalyse mit klassischen mikrobiologischen und molekularbiologischen Techniken konnte gezeigt werden, dass die Konzentrationen an Gram-negativen Stäbchenbakterien während der Entzündung in Ileum und Colon anstiegen. Die bakteriellen Faktoren, die eine Ileitis induzierten, wurden durch den Einsatz von gnotobiotischen TLR-defizienten Mäusen mit definierter bakterieller Rekolonisierung ermittelt. Hierbei zeigte sich, dass eine Ileitis durch das LPS von akkumulierenden *E. coli* über die TLR4-vermittelte Signaltransduktion verstärkt wurde. Die Entzündungsreaktionen konnten durch Behandlung mit Antibiotika oder dem LPS-Antagonisten Polymyxin B gebessert werden. In Folge einer *H. pylori*-Infektion kam es im Mausmagen zu einer erhöhten Diversität der Bakterienflora durch die Besiedelung mit Bakterienarten, die normalerweise das Colon kolonisieren. Eine derartige Florenverschiebung konnte durch eine Vakzinierung gegen *H. pylori* verhindert werden. Da durch den Erhalt der kommensalen Laktobazillen-Flora im Magen der Maus potentiell nitrosaminbildende Bakterien nicht wachsen konnten, hat sich die Immunisierung gegen *H. pylori* im präklinischen Tiermodell als sinnvoll erwiesen. Die Tiermodelle zur *T. gondii*-induzierten Ileitis und DSS-Colitis erlauben eine reproduzierbare Analyse entzündungsrelevanter Komponenten und damit die Möglichkeit, therapeutische Ansatzpunkte, wie z.B. den Einsatz von Lipopolysaccharid-Inhibitoren, die Blockade von TLR4 oder dem LPS-Bindeprotein oder den Einsatz von Probiotika, unter definierten Bedingungen zu analysieren.

1 Einleitung

1.1 Chronisch-entzündliche Darmerkrankungen beim Menschen

Morbus Crohn und Colitis ulcerosa sind chronisch-entzündliche Darmerkrankungen (CED), die in Schüben verlaufen und bisher nicht heilbar sind. Beide Krankheitsbilder werden durch überschüssige Immunreaktionen vermittelt, deren genaue Ursache nicht bekannt ist. Bei beiden Erkrankungen bestehen ulzerative Entzündungen im Gastrointestinaltrakt. Beim M. Crohn ist die Entzündungsreaktion meist am Übergang zwischen Dünndarm und Dickdarm lokalisiert, doch die Entzündungen können im gesamten Verlauf des Verdauungstrakts auftreten. Gesunde und entzündete Darmabschnitte können nebeneinander liegen. Der Entzündungsprozess erfasst hierbei alle Schichten der Darmwand, so dass es häufig zur Bildung von Fisteln, Fissuren, eitrigen Abszessen und Stenosen kommt. Die Colitis ulcerosa ist im Gegensatz zum M. Crohn auf die Darmschleimhaut (Mukosa) des Colons beschränkt. Zu Beginn der Erkrankung haben ca. 25-55% der Patienten nur einen Befall des Mastdarms. Im Verlauf der Krankheit breitet sich die Colitis aufsteigend unterschiedlich weit ins Colon aus (www.dccv.de; Internetseite: Deutsche Morbus Crohn / Colitis ulcerosa Vereinigung e.V.).

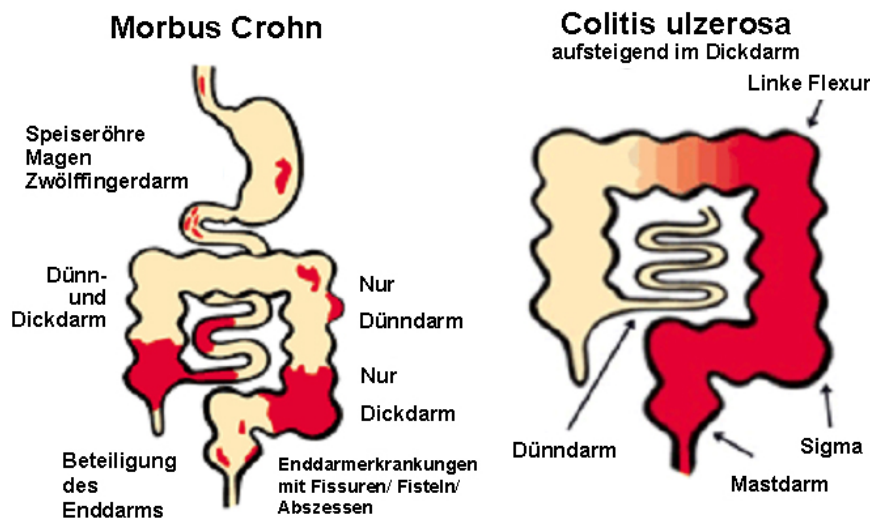


Abb. 1: Morbus Crohn und Colitis ulcerosa. Lokalisationen von Entzündungsprozessen im Gastrointestinaltrakt. M. Crohn kann sich im gesamten Verdauungstrakt manifestieren, die Colitis ulcerosa ist zu 95% auf das Colon beschränkt (Quelle: Kompetenznetz Darmerkrankungen; www.kompetenznetz-ced.de).

Die Inzidenz von M. Crohn beträgt etwa 10-200 / 100.000 pro Jahr weltweit, wobei es seit den 1960er Jahren einen 8-10fachen Anstieg gibt. Die Inzidenz ist in Nordeuropa und Nordamerika weit höher als in Ländern der südlichen Hemisphäre. Der Lebensstandard, verbunden mit bestimmten Ernährungsgewohnheiten, könnte damit zur Krankheitsentstehung beitragen. Bei der Colitis ulcerosa beobachtet man eine stabile weltweite Inzidenz von 10-20/100.000 pro Jahr und keine eindeutige Abhängigkeit vom

Lebensstandard (MacDonald & Monteleone 2005). In Deutschland sind etwa 130.000 Menschen an M. Crohn und ca. 165.000 an Colitis ulcerosa erkrankt. Meist erkranken junge Menschen, Männer und Frauen zu etwa gleichen Teilen, im Alter zwischen 20-35 Jahren, wobei aber auch Kinder und ältere Menschen betroffen sein können. Die Krankheitsausprägung kann bei M. Crohn und Colitis ulcerosa unterschiedlich stark sein. Bei beiden Erkrankungen kommt es in der Regel zu Durchfällen und Schmerzen. Bei beiden Krankheitsformen können weiterhin Folgeerscheinungen wie z.B. Stenosen durch rezidivierende Entzündungen, Ernährungsmängel, Gewichtsverlust, erhöhtes Krebsrisiko und häufige diagnostische und chirurgische Eingriffen, sowie extraintestinale Manifestationen wie z.B. schmerzhaftes Gelenkentzündungen die Lebensqualität der CED-Patienten zusätzlich beeinträchtigen (Kompetenznetz Darmerkrankungen; www.kompetenznetz-ced.de). Forschungsergebnisse aus der Grundlagenforschung, der Humangenetik und aus klinischen Studien legen nahe, dass eine genetische Disposition, die Darmflora und Umwelteinflüsse bei Auslösung und Ausprägung der CED eine Rolle spielen können. Vermutlich kommt es nach einer Störung der intestinalen Epithelbarriere zu einem Kontakt von natürlichweise im Darm lebenden Bakterien (Kommensalen) mit Immunzellen, die in einem genetisch prädisponierten Wirt eine überschiessende Immunantwort auslösen. Sowohl M. Crohn und Colitis ulcerosa zeigen eine aktivierte angeborene (über Makrophagen und neutrophile Granulozyten) und erworbene (über T- und B-Zellen) Immunantwort und einen Zusammenbruch der Toleranz gegenüber kommensalen Darmbakterien. Die Toleranz gegenüber der eigenen Bakterienflora wird normalerweise durch regulatorische T-Zellen (Treg), natürliche Killer (NK) T-Zellen, B-Lymphozyten und dendritische Zellen und deren Sekretion von Zytokinen wie z.B. TGF-beta (engl.: Transforming Growth Factor-beta), Interleukin 10 (IL-10) und Interferon-alpha/beta erreicht. Bei beiden Erkrankungen ist die Menge an aktivierten Makrophagen und dendritischen Zellen in der Lamina propria erhöht, und es kommt zu einer gesteigerten Ausschüttung von proinflammatorischen Zytokinen und Chemokinen, sowie zu einer verstärkten Expression von Adhäsions- und ko-stimulatorischen Molekülen (Sartor 2006; MacDonald & Monteleone 2005).

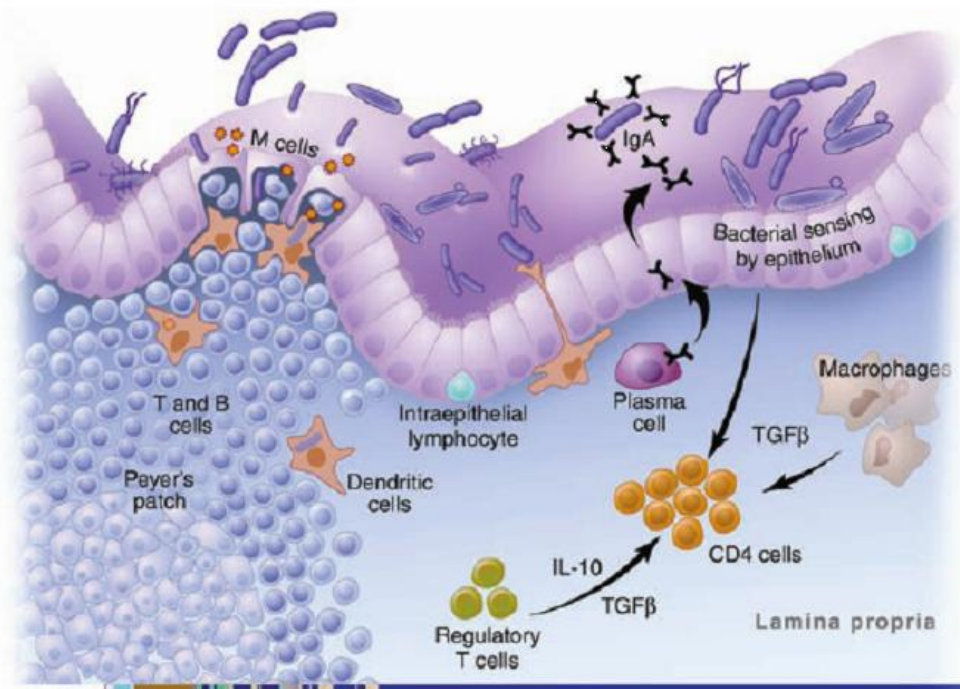


Abb. 2: Immunregulatorische Zellen und Prozesse im Darm. Das darmassoziierte lymphoide Gewebe (engl.: gut-associated lymphoid tissue, GALT) enthält spezialisierte M-Zellen, die kontinuierlich bakterielle Antigene vom Lumen ins lymphoide Gewebe aufnehmen. Dendritische Zellen (DC) in der Lamina propria (LP) können zwischen den Epithelzellen ebenfalls Bakterien aus dem Darmlumen aufnehmen. Das Epithel ist angefüllt mit $CD8^+$ T-Zellen (Intraepitheliale Lymphozyten, IEL), die Lamina propria enthält $CD4^+$ T-Zellen, Makrophagen und IgA-Antikörper-produzierende Plasmazellen. T-Zell-initiierte Gewebeschädigungen können durch immunsuppressive Zytokine (IL-10 und TGF- β) und regulatorische T-Zellen (Treg) inhibiert werden. (nach MacDonald & Monteleone 2005).

Die zelluläre adaptive Immunantwort wird über T-Helferzellen ($CD4^+$) vermittelt. Nach dem Kontakt mit antigenpräsentierenden Zellen (APZ) kommt es zur Aktivierung naiver T-Helferzellen mit einer anschließenden Differenzierung in verschiedene Untergruppen und zur klonalen Expansion (Murphy & Reiner 2002). Generell wird eine Differenzierung von aktivierten $CD4^+$ T-Helferzellen zum Typ1 (Th1) oder Typ2 (Th2) beschrieben. Th1-Zellen produzieren überwiegend IFN- γ , TNF- β und IL-2. Diese Zytokine werden einerseits zur Überwindung intrazellulärer Infektionen benötigt, sind aber andererseits auch mitverantwortlich für die Gewebeerstörung bei chronisch entzündlichen Erkrankungen. Th2-Zellen produzieren vor allem IL-4, IL-5 und IL-13 und sind zur Bekämpfung parasitärer Erkrankungen notwendig, spielen aber auch eine wichtige Rolle in der Pathogenese allergischer Erkrankungen (Abbas *et al.* 1996; Kamradt & Burmester 1998; Infante-Duarte & Kamradt 1999). IL-4 führt z.B. zur Sensibilisierung basophiler Mastzellen, IL-5 zur Aktivierung eosinophiler Granulozyten, IL-10, IL-13 und TGF- β wirken inhibierend auf IFN- γ . Die vorherrschenden Zytokine IL-12 aus Th1-Zellen bzw. IL-4 aus Th2-Zellen wirken inhibierend auf den jeweiligen anderen Aktivierungsweg. Ob sich aus einer undifferenzierten Vorläuferzelle entweder eine Th1- oder einer Th2-Zelle

entwickelt, wird im besonderem durch Zytokine gesteuert (Murphy *et al.* 2000). Die Sekretion von IL-12 und IL-18 aus APZ resultiert z.B. in einer Differenzierung von aktivierten CD4⁺ T-Zellen zu Th1-Zellen, die ihrerseits IFN-gamma ausschütten. Th-Zellen, die andere als die o.g. typischen Th1- oder Th2-Zytokine produzieren, sind beschrieben als Th0 (Firestein *et al.* 1989), Th3 (Chen *et al.* 1994) oder Tr1 (Groux *et al.* 1997). Th0-Zellen können sowohl Typ 1- als auch Typ 2-Zytokine produzieren. Der Status der Th0-Zellen als eine stabil differenzierte Subpopulation ist allerdings noch nicht voll geklärt (Abbas *et al.* 1996; Firestein *et al.* 1989; Löhning *et al.* 1999). Th3-Zellen produzieren vor allem TGF-beta und verhindern möglicherweise die Differenzierung von Th1- und Th2-Zellen (Chen *et al.* 1994). *In vitro* polarisierten Tr1-Zellen, gekennzeichnet durch die Produktion von IL-10 und IL-5, wird eine immunsupprimierende Wirkung zugeschrieben (Groux *et al.* 1997). Regulatorische T-Zellen (Treg), die Einfluss auf die Modulation entzündlicher Prozesse haben, sind durch Ausprägung verschiedener Marker voneinander abgrenzbar. Dass sind z.B. CD4⁺CD25⁺ auf natürlich vorkommenden regulatorischen T-Zellen (N-Tregs), CD4⁺CD25⁻ bei induzierbaren naiven T-Zellen (Tr1), CD4⁺CD25⁺DX5⁺ bei natürlichen Killer T-Zellen (TrNKT) und CD4⁺CD25⁺CD8⁺ bei zytotoxischen T-Zellen (TrCTC) (McGee & Agrawal 2006). Der Unterschied zwischen M. Crohn und Colitis ulzerosa hinsichtlich immunpathologischer Antwort besteht darin, dass beim M. Crohn eine vom Th1-Typ vermittelte Antwort vorliegt. Dabei differenzieren aktivierte CD4⁺ T-Helferzellen nach Stimulation durch IL-12 und IL-18 aus Makrophagen und DCs zu T-Zellen vom Typ1 (Th1-Zellen), die eine starke IFN-gamma Produktion bewirken. Isolierte CD4⁺ T-Zellen von Crohn-Patienten produzieren wie für eine Th1-Antwort typisch IFN-gamma und IL-12p40. Makrophagen von M. Crohn Patienten können grosse Mengen an Th1-induzierendem IL-12 und IL-18 produzieren. Die sich daraus differenzierenden Th1-Zellen sind durch diese Zytokine gegen Apoptose geschützt und können so den Entzündungsprozess in Gang halten (Monteleone *et al.* 1999; MacDonald & Monteleone 2001, 2005). Das Zytokinprofil der Colitis ulzerosa wird dagegen als Th2-Antwort eingestuft. Der bei einer Th2-Antwort vorliegende Anstieg von IL-4 und IL-5 ist aber in ulzerierten Geweben nicht permanent erkennbar. Somit wird die T-Zell Antwort bei der Colitis ulzerosa als eine eher atypische Th2-Antwort beschrieben, bei der natürliche Killer T-Zellen IL-13 ausschütten, in deren Folge ein zytotoxischer Epithelschaden im Colon herbeigeführt wird (Fuss *et al.* 1996, 2004).

1.2 Die Rolle der Darmflora bei chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen

In der Darmflora des Menschen finden sich mindestens 50 Bakteriengattungen mit einigen hundert Arten (Finegold *et al.* 1983; Salfinger *et al.* 1980; Simon *et al.* 1984), wobei die Bakteriendichte und Diversität vom Magen zum Dickdarm konstant zunimmt. Die Bakterienkonzentration im Colon beträgt etwa 10^{10} – 10^{12} Bakterien pro Gramm Darminhalt. Die dominanten Gruppen sind *Bacteroidales*, *Bifidobacterium*,

Enterobacteriaceae, *Clostridiales* und *Lactobacillales*. Mehr als 90% der Darmflora sind obligate Anaerobier. Im gesunden Zustand machen *Escherichia coli* und andere, nahe verwandte Enterobakterienarten nur einen geringen Teil der Flora aus (Donskey *et al.* 2003). Bakterien der normalen Darmflora, die durch Rezeptoren des angeborenen Immunsystems (siehe unten) erkannt werden, sind an der Auslösung und Ausprägung chronisch-entzündlicher Darmerkrankungen (CED) beim Menschen und im Tiermodell (Wirtz & Neurath 2000; Thompson-Chagoyan *et al.* 2005; Tlaskalova-Hogenova *et al.* 2004, 2005; Sartor 2006) ursächlich beteiligt. Die zugrundeliegenden Mechanismen sind trotz zahlreicher Untersuchungen noch weitgehend unklar, und insbesondere für das Ileum ist nicht bekannt, wie sich definierte Bakterienarten auf die Entzündungsreaktion auswirken. Das immunologische Sensor-Effektorsystem des Gastrointestinaltraktes reagiert auf die Bakterien normalerweise tolerant. Man nimmt deshalb an, dass genetische Prädisposition und/oder Veränderungen der Darmflora die Auslösung und Ausprägung entzündlicher Darmerkrankungen determinieren (MacDonald & Monteleone 2005).

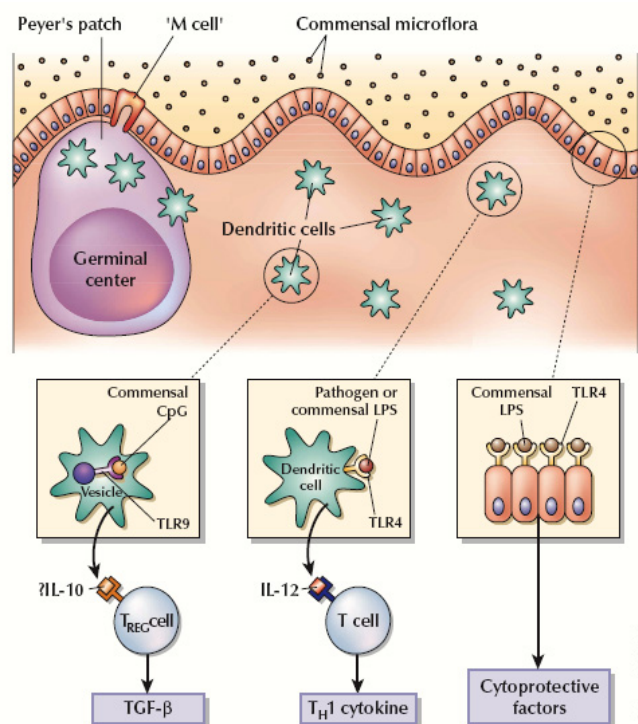


Abb. 3: Signalweiterleitung durch TLRs in der Mukosa. Kommensale Darmbakterien haben i.d.R. einen schützenden Effekt oder werden vom Immunsystem toleriert. Bei Störungen der intestinalen Barriere können Antigene aus kommensalen und/oder pathogenen Bakterien entzündliche Immunantworten auslösen (entnommen aus Strober 2004)

Individuelle und altersspezifische Variabilitäten der Darmflora (Franks *et al.* 1998; Sghir *et al.* 2000; Hopkins *et al.* 2001) weisen darauf hin, dass das angeborene Immunsystem auch auf die Zusammensetzung der Darmflora Einfluß nehmen könnte (van de Merwe *et al.* 1983; Medzhitov & Janeway 1997). Es sollte demnach möglich sein CED, wie M. Crohn oder Colitis ulcerosa durch gezielte Immunmodulation und/oder Veränderung der

Darmflora therapeutisch zu beeinflussen oder im Idealfall den Ausbruch der Erkrankung zu verhindern bzw. schwere klinische Verläufe durch geeignete Massnahmen abzumildern. Eine krankheitsauslösende und/oder -unterhaltende Rolle der „normalen“ Darmflora bei der CED ist inzwischen gut belegt (Sartor 1995, 1997a, 2004, 2006; Elson *et al.* 2001; Swidsinski *et al.* 2002; Campieri & Gionchetti 2001; MacDonald & Monteleone 2005). Verschiedene Tiermodelle haben einen wesentlichen Beitrag zur Aufklärung der Pathogenese dieser Erkrankungen geleistet (Pizarro *et al.* 2003; Elson *et al.* 2005). Das bisher einzige detaillierte Modell für eine spontan-chronische Ileitis ist die SAMP1/Yit(Fc) Maus, die nach mehreren Monaten eine chronische Entzündung im Dünndarm entwickelt (Matsumoto *et al.* 1998; Kosiewicz *et al.* 2001; Bamias *et al.* 2002). Für die chronische Colitis, die sich in dem Mausstamm C3H/HeJBir ausbildet konnte erstmals gezeigt werden, dass bakterielle Antigene der kommensalen Bakterienflora an der Ausbildung von aggressiven T- und B-Zellantworten beteiligt sind (Sundberg *et al.* 1994, Elson *et al.* 2004). Durch definierte Besiedelung keimfrei gehaltener Tiere konnte gezeigt werden, dass mehrere Bakterienarten im Darm von Nagetieren, die durch Deletion oder Überexpression von Genen Immundefekte aufweisen, eine experimentelle Colitis hervorrufen können (Rath *et al.* 1996, 1999ab, 2001). Ausserdem gibt es Hinweise, dass die Diversität der Darmflora im Verlauf der Entzündung stark eingeschränkt wird. Sowohl bei der CED des Menschen (Boudeau *et al.* 1999; Seksik *et al.* 2003; Darfeuille-Michaud 1998; Martin *et al.* 2004; Barnich *et al.* 2003), als auch bei der experimentellen Darmentzündung im Tiermodell (Schuppler *et al.* 2004) konnte gezeigt werden, dass *Enterobacteriaceae* und *Bacteroides*-Arten der Darmflora im Darm akkumulieren und mit Entzündungsherden assoziiert sind (Ott *et al.* 2004). Der initiale Kontakt zwischen Darmbakterien und Immunzellen erfolgt über die Rezeptoren des angeborenen Immunsystems, die mikrobielle Zellbestandteile erkennen und Immunantworten auslösen (Medtshitov & Janeway 2000; Gewirtz & Mandara 2001; Pulendran *et al.* 2001). Über die sog. „Toll-like Rezeptoren“ (TLR) kann das Immunsystem extrazelluläre Mikroorganismen detektieren (Akira *et al.* 2001; Kaisho & Akira 2003; Takeda *et al.* 2003; Takeda 2005), während die Proteine der Caspase recruitment domain (CARD)/ nucleotide binding and oligomerization domain (NOD)-Familie (intrazelluläre Bakterien erkennen (Inohara *et al.* 2001; Silverman & Maniatis 2001; Ogura *et al.* 2001; Hugot *et al.* 2001, Hugot 2006; Rescigno & Nieuwenhuis 2007). Die TLR- bzw. CARD/NOD-abhängige Aktivierung des Immunsystems geschieht über Signalkaskaden, an denen verschiedene Adapterproteine, wie z.B. das MyD88-Protein (myeloid differentiation primary response protein), beteiligt sind (Kaisho & Akira 2003; Uematsu & Akira 2006).

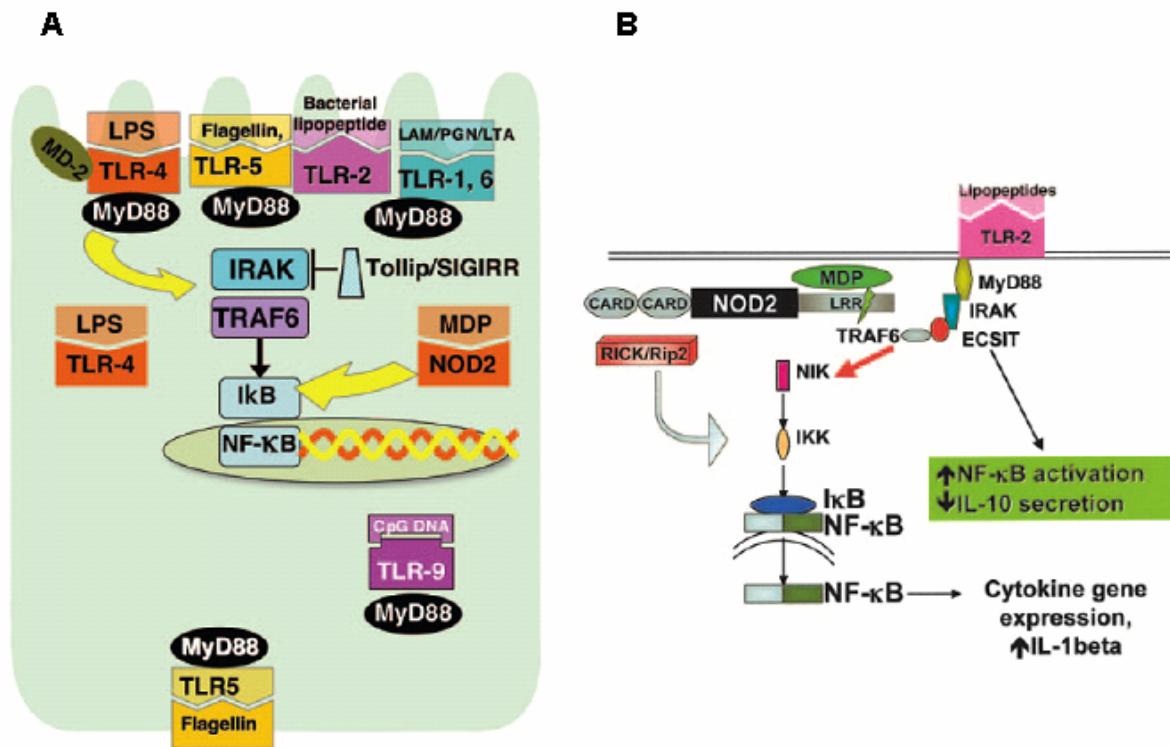


Abb. 4: Membranständige und intrazelluläre TLR- und CARD15/NOD2-Signalweiterleitung von intestinalen Epithelzellen mit Liganden und Signalwegen. (A) Die TLR-4 und MD-2 Expression ist in intestinalen Epithelzellen niedriger als in Immunzellen. Eine Intrazelluläre Erkennung von LPS via TLR-4, assoziiert mit dem Golgi-Apparat, wurde beschrieben. TLR-2 wird möglicherweise an der Oberfläche nur schwach exprimiert und beeinflusst inhibitorische Moleküle (Tollip, SIGIRR). TLR-5 kann basolateral und apikal exprimiert werden. NOD2 und TLR-9 sind intrazelluläre Rezeptoren. (B) Modell für TLR-2 und CARD15/NOD2 Interaktionen in der Lamina propria. M. Crohn assoziierte Mutationen in CARD15/NOD2 (in Abb.4B; Blitzzeichen bei LRR) resultieren in verminderter NF-kappaB Aktivierung durch Muramyldipeptid (MDP) und verminderter IL-10 Freisetzung als Antwort auf eine TLR-2 Signalweiterleitung (entnommen aus Abreu *et al.* 2005).

Nach Bindung der Bakterienbestandteile an TLRs bzw. NOD-Proteine, resultiert eine Aktivierung des Immunmediators NF- κ B, der die Zytokinsynthese induziert (Hallmann *et al.* 2001). Polymorphismen der TLR- und CARD/NOD-Proteine führen zu immunologischen Fehlregulationen und sind offenbar an der Immunpathogenese der CED beteiligt. So wurde gezeigt, dass Mutationen in TLR4 (Franchimont *et al.* 2004; Torok *et al.* 2004) und CARD15/NOD2 (Ogura *et al.* 2001; Hugot *et al.* 2001; Hampe *et al.* 2001) signifikant mit der CED beim Menschen assoziiert sind. Aktuelle Ergebnisse belegen, dass Mutationen im CARD15/NOD2-Gen auch mit entzündlichen Veränderungen der Darmmukosa bei Knochenmark- oder Stammzell-transplantierten Patienten in Zusammenhang stehen (Holler *et al.* 2004). In entsprechenden gendefizienten Mäusen konnte gezeigt werden, dass NOD2 als negativer Regulator von TLR2-vermittelten Immunantworten wirkt (Watanabe *et al.* 2004) und diese Funktion könnte erklären, warum Mutationen in CARD15/NOD2 auch im Menschen mit der Entstehung von Darmentzündung assoziiert sind. So findet sich mindestens eine von drei bekannten Mutationen in der CARD15 Region bei 25-30% der europäisch-stämmigen, allerdings nicht bei asiatisch-afrikanisch-stämmigen M. Crohn Patienten (Newmann & Siminovitch

2005). Die CARD15/NOD2 Mutation ist demnach eher als Prädisposition zu sehen und steht vielleicht nicht in direktem, kausalem Zusammenhang mit dem M. Crohn, da eine erhöhte Inzidenz von M. Crohn bei Trägern der CARD15/NOD2 Mutation nicht gefunden werden konnte (Rescigno & Nieuwenhuis 2007). Erkennungsmoleküle des angeborenen Immunsystems werden zell- bzw. gewebspezifisch exprimiert. Im Maudarm werden die für Bakterien relevanten TLRs konstitutiv exprimiert, wobei die Produktion im Colon am stärksten ist (Ortega-Cava *et al.* 2003). Studien mit Colonepithelzellen des Menschen zeigten, dass TLR4 und der Ko-Rezeptor MD-2 in bestimmten Zelllinien nur in geringem Maß exprimiert werden und somit eine verminderte Reaktion auf Lipopolysaccharid (LPS) stattfindet (Abreu *et al.* 2001, Naik *et al.* 2001, Suzuki *et al.* 2003). Auch die Antwort auf TLR2-Liganden ist bei intestinalen Epithelzellen nur schwach ausgeprägt (Melmed *et al.* 2003) und eine längere Gabe von LPS oder Lipoteichonsäure (LTA) kann eine Kreuztoleranz von TLR2- bzw. TLR4-Liganden induzieren (Otte *et al.* 2004). Das angeborene Immunsystem kann demnach über TLRs vermutlich nicht zwischen pathogenen und kommensalen Bakterien diskriminieren, wenn keine Invasion ins subepitheliale Gewebe erfolgt oder bestimmte Pathogenitätsfaktoren vorliegen (Abreu *et al.* 2005). Die Tatsache, dass bei der durch Dextransodiumsulfat-(DSS) induzierten Colitis eine verstärkte TLR-Expression zu beobachten war, weist darauf hin, dass die TLRs bei entzündlichen Prozessen des Darms eine wichtige Rolle spielen. Es wird auch vermutet, dass TLRs und CARD15/NOD2 bei der durch dendritische Zellen vermittelten immunologischen Toleranz gegenüber Darmbakterien beteiligt sind (Gewirtz & Mandara 2001; Pulendran *et al.* 2001; Akira *et al.* 2001; Kaisho & Akira, 2003; Medvedev *et al.* 2001; Rescigno *et al.* 2001; Michelsen *et al.* 2001; Strober 2004; Rescigno & Chieppa 2005). Die Interaktionen zwischen Darmflora und mukosalem Immunsystem sind derzeit Gegenstand intensiver Forschungstätigkeiten. Neueste Arbeiten am Menschen und im Mausmodell belegen, dass die Modulation der Darmflora entzündliche Prozesse im Colon mildern kann. Bei Patienten mit allogener Knochenmark-Transplantation führte die Gabe eines probiotisch wirkenden *Lactobacillus rhamnosus* GG zu einem Rückgang der akuten GvHD (Gerbitz *et al.* 2004). Im einem DSS-Colitismodell mit Mäusen konnte gezeigt werden, dass die Erkennung bakterieller DNA (aus einer probiotischen Formulierung; VSL-3) durch TLR9 eine Reduktion der entzündlichen Aktivität bewirkt (Rachmilewitz *et al.* 2004). In diesem Zusammenhang ist auch die Beobachtung von Bedeutung, dass die Erkennung von Darmbakterien durch TLRs für die Differenzierung von Enterozyten essentiell zu sein scheint. Differenzierte Enterozyten der Darmmukosa können vor der toxischen Wirkung von DSS besser schützen als wenig differenzierte Zellen (Rakoff-Nahoum *et al.* 2004). Die in der vorliegenden Arbeit beschriebenen Experimente bauen direkt auf den beschriebenen aktuellen Befunden auf und sollten den Erkenntnisstand durch Aufklärung der beteiligten Mechanismen sowohl auf Wirtsseite, als auch durch eine umfassende Analyse der Darmflora sinnvoll erweitern. So sollte festgestellt werden, welche Mechanismen der Interaktion zwischen Darmbakterien und dem Immunsystem in

der entzündeten Darmmukosa zugrundeliegen und ob eine Modulation der Darmflora zur Milderung des Entzündungsgeschehens beitragen kann.

1.3 Tiermodelle für Darmentzündung (Ileitis und Colitis)

In Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Oliver Liesenfeld am Institut für Infektionsmedizin, Abt. Medizinische Mikrobiologie und Infektionsimmunologie (Charité Universitätsmedizin Berlin, Campus Benjamin Franklin) wurden in Vorarbeiten Mausmodelle für verschiedene Formen der Darmentzündung entwickelt. Da sich die Colitis ulcerosa fast ausschliesslich im Colon manifestiert und der M. Crohn im Gegensatz dazu auch proximal höher gelegene Darmabschnitte befallen kann, wurden für Colitis und Ileitis zwei separate Mausmodelle etabliert. Die durch orale Infektion mit dem Parasiten *Toxoplasma gondii* (*Eimeriida*, *Sarcocystidae*) induzierte terminale Ileitis (Liesenfeld 2002) ist ein Modellsystem, in dem die Wechselwirkungen der Darmflora mit der entzündeten Dünndarm-Mukosa untersucht werden können. Die orale Gabe von 100 Zysten *T. gondii* (Stamm ME49) führt bei empfänglichen Mäusen mit dem Haplotyp 2b zu einer massiven Entzündung des terminalen Ileums. Darmpathologie und das Zytokinprofil entsprechen einer Th1-Immunantwort und sind ähnlich wie beim M. Crohn im akuten Schub (Liesenfeld 2002). Am Tag sieben nach oraler *T. gondii*-Infektion findet sich bei infizierten Tieren in der Fraktion der mononukleären Zellen in der Lamina propria des kleinen Intestinums (engl.: lamina propria mononuclear cells, LPC) eine erhöhte Anzahl von CD4⁺ T-Zellen im Vergleich zu nicht-infizierten Tieren. Die Mengen an mRNA für IFN-gamma, TNF-alpha und iNOS (induzierbare Stickstoffmonoxid-Synthase) sind im Ileum infizierter Tieren signifikant erhöht. Da die Gabe von Antikörpern gegen TNF-alpha und der iNOS-Inhibitor Aminoguanidin Nekrosen verhindern und die Überlebenszeit verlängern können, trägt die Aktivierung von iNOS durch IFN-gamma und TNF-alpha über eine starke NO-Ausschüttung sicherlich zur hohen Mortalität in diesem Modell bei (Liesenfeld *et al.* 1996, 1999ab). Da susceptible Mäuse spätestens acht Tage nach Infektion mit *T. gondii* zu 100% verstorben sind, simuliert das in der vorliegenden Arbeit verwendete akute Modell am ehesten CED im akuten Schub. Die mit dem M. Crohn vergleichbaren Zytokinprofile, die CD4⁺ T-Zell-vermittelten histopathologischen Veränderungen und erkennbare protektive Effekte durch IL-10 und TGF-beta (Suzuki *et al.* 2000; Buzoni-Gatel *et al.* 2001; Mennechet *et al.* 2004) stellen die *T. gondii*-induzierte Ileitis als ein Modell zur Untersuchung Th1-vermittelter Pathomechanismen bei entzündlichen Darmerkrankungen dar. In der vorliegenden Arbeit wurden in diesem Modell, sowohl die Veränderungen der Darmflora während der Entzündung, als auch die Beteiligung von Bakterien bzw. Bakterienkomponenten an der Entzündungsreaktion im Darm untersucht. Die akute Dextransodiumsulfat-induzierte Colitis (DSS-Colitis) entwickelt sich nach sechs bis acht Tagen Behandlung mit 3-4% DSS im Trinkwasser (Rath *et al.* 1996, 1999ab; Siegmund *et al.* 2001). Histologisch ist die DSS-Colitis durch die Infiltration von Entzündungszellen in die Lamina propria mit fokaler

Kryptenzerstörung, lymphoider Hyperplasie und epithelialen Ulzerationen charakterisiert (Okayasu *et al.* 1990; Cooper *et al.* 1993; Dieleman *et al.* 1998). Diese Schäden sind vermutlich auf einen toxischen Effekt von DSS zurückzuführen, der einen Epithelschaden verursacht, verstärkt über Phagozytose von DSS durch Zellen der Lamina propria (LPC) und die Ausschüttung von IFN-gamma und TNF-alpha (Okayasu *et al.* 1990). Die DSS-Colitis kann auch T-Zell-unabhängig ausgelöst werden, da sie auch in SCID-Mäusen beobachtet wird, die über keine funktionalen T- und B-Zellen verfügen (Axelsson *et al.* 1996; Dieleman *et al.* 1994). Neben der akuten DSS-Colitis gibt es auch Modelle zur Induktion einer chronischen DSS-Colitis (Dieleman *et al.* 1998; Kojouharoff *et al.* 1997; Obermeier *et al.* 1999; Hans *et al.* 2000ab; Melgar *et al.* 2005). In dem Modell von Melgar *et al.* erreichten die Mäuse in der Erholungsphase ihr ursprüngliches Gewicht, wobei vier Wochen nach Absetzen des DSS histopathologische Veränderungen und erhöhte Werte von IL-1beta, IL-12p70 und IL-17 nachweisbar waren. Möglicherweise folgt nach der akuten entzündlichen Antwort durch Makrophagen/Neutrophile, eine Th-Zellen-vermittelte Immunantwort, die zu einer chronischen Colitis führt (Hans *et al.* 2000b). Die Herstellung keimfreier Tiere durch Antibiotikabehandlung und die anschließende orale Besiedlung mit definierten Bakterienarten wurde im Laufe dieser Arbeit in Kooperation mit Dr. Markus M. Heimesaat am Forschungsinstitut für Experimentelle Medizin (FEM) etabliert. Um einen möglichen Einfluß des Immunsystems auf die Ausbildung der Darmflora und die Auslösung und Ausprägung der Entzündungsreaktion zu untersuchen, wurden Mausstämme eingesetzt, die für bakterielle Rezeptormoleküle defizient waren. In den Tierexperimenten zur Ileitis kamen TLR2-, TLR4- und TLR2+4-defiziente Mäuse zum Einsatz. Für Vorversuche zu den Colitisexperimenten wurden auch Tiere verwendet, die das Lipopolysaccharid-bindende Protein (LBP) nicht produzieren können (LBP^{-/-}). Die Untersuchungen zum Einfluß einer *H. pylori*-Infektion auf die Magenflora wurden mit Balb/c-Mäusen in Kooperation mit Dr. Toni Aebischer am Max-Planck-Institut für Infektionsbiologie (Prof. T.F. Meyer, Berlin) durchgeführt.

1.4 Auswirkungen einer *H. pylori*-Infektion auf die Magenflora und Vakzinierungsmodelle gegen *H. pylori* bei Tier und Mensch

Die bakterielle Besiedlung des Magens ist mit einer Vielzahl von gastrointestinalen Störungen assoziiert. Dabei stellt die Infektion mit *Helicobacter pylori* ein besonderes Risiko dar (Peek & Blaser 2002). *H. pylori* ist ein Gram-negatives Stäbchen Bakterium (Proteobacteria; Campylobacterales), das sich im Magen ansiedeln kann (Marshall & Warren 1984). Die weltweite Infektionsrate mit *H. pylori* beträgt etwa 50% (Goodman & Cockburn 2001), wobei die Prävalenz der *H. pylori*-Infektion Abhängigkeit von der geographischen Region, dem Alter und dem sozioökonomischen Status variieren kann (Brown 2000). In Ländern mit niedrigen hygienischen Standards kann die Infektionsrate

über 90% betragen (Pounder *et al.* 1995; Brown 2000). Neuinfektionen finden besonders im Kindes- bzw. Jugendalter statt (Bodhidatta *et al.* 1993) und es wurde beobachtet, dass Infektionen z.B. auch familiär gehäuft auftreten können (Drumm *et al.* 1990; Rowland & Drumm 1998; Drumm & Rowland 2003). Als Übertragungsmodus der Infektion wird eine fäkal-orale aber auch eine oral-orale Übertragung diskutiert (Megraud 1995). Normalerweise können Bakterien im sauren Magenmilieu des Menschen bei einem pH von 2 nicht überleben. *H. pylori* ist als einziges Bakterium in der Lage, den menschlichen Magen dauerhaft zu kolonisieren. Als Schutz gegen die Magensäure dient ein Pathogenitätsfaktor von *H. pylori*, das Enzym Urease. Sie spaltet den im Magensaft enthaltenen Harnstoff zu Ammoniak und CO₂, wobei als Endprodukte Ammonium-Ionen (NH₄⁺) und Bikarbonat-Ionen HCO₃⁻ vorliegen. Die Bikarbonat-Ionen schützen die Bakterien vor dem Angriff durch die Magensäure. Für eine Kolonisierung der Magenschleimhaut ist die Produktion von Urease daher absolut notwendig (Segal *et al.* 1992; Solnick *et al.* 1995; Stingl & De Reuse 2005). Weitere Pathogenitätsfaktoren und Eigenschaften, die das Überleben von *H. pylori* im Magen ermöglichen und zur Entstehung akuter wie auch chronischer Verlaufsformen beitragen sind: Flagellen, Adhärenzfaktoren, cag-Pathogenitätsinseln (cag PAI), vakuolisierendes Zytotoxin (VacA), LPS und hohe genetische Variabilität (Kraft & Suerbaum 2005; Lee & Josenhans 2005; Naumann 2005; Odenbreit 2005). Flagellen und Adhärenzfaktoren befähigen *H. pylori*, sich durch die Mukusschicht des Magens zu bewegen und sich an Magenepithelzellen anzuheften (Odenbreit 2005). Nach erfolgreicher Kolonisierung von *H. pylori*, kann es bei den Patienten zu einer akuten Gastritis kommen. Dies ist aber nur in etwa 10-20% aller Fälle so, obwohl bei allen *H. pylori*-infizierten histopathologische Änderungen der Magenmukosa nachweisbar sind. Die akute *H. pylori*-induzierte Gastritis kann in eine chronische Form übergehen. Die Ulkuskrankheiten, z.B. das Ulcus duodenale bzw. ventriculi sind durch Substanzdefekte der Schleimhaut gekennzeichnet und können schmerzhaft, aber auch symptomfrei verlaufen. Die aus einer chronischen Form resultierenden Gewebeveränderungen und das Vorliegen entsprechender Pathogenitätsfaktoren z.B. cag-Pathogenitätsinsel und VacA können zum MALT-(mucosa-associated lymphoid tissue) Lymphom oder zur Entstehung eines Magenkarzinoms beitragen (Ernst & Gold 2000; Suerbaum & Michetti 2002). Eine *H. pylori*-Infektion führt möglicherweise eine Änderung der mikrobiellen Besiedelung des Magens herbei, die ein zusätzliches Risiko für assoziierte Erkrankungen nach sich zieht. Aktuell wurden in *H. pylori*-infizierten Patienten, die mit Protonenpumpeninhibitoren behandelt wurden, erhöhte gastrische Konzentrationen an Bakterien gefunden, die nitrosaminhaltige Verbindungen produzieren können (Correa 1992; Mowat *et al.* 2000; Mowat & McColl 2001). So könnte eine Überwucherung der Magenmukosa mit kommensalen Bakterien des Colons das Krebsrisiko steigern. Die klassische Therapie von Patienten mit klinischen Symptomen und nachgewiesener *H. pylori*-Infektion besteht in einer Kombination aus den Antibiotika Clarithromycin und Metronidazol und einem Protonenpumpeninhibitor.

Dieser Ansatz ist kostenintensiv und oftmals schlägt die Behandlung wegen mangelnder Kooperation der Patienten fehl (Vakil 2005). Zudem wird eine steigende Antibiotikaresistenz gegen Clarithromycin und Metronidazol in *H. pylori*-Stämmen beobachtet (McLoughlin *et al.* 2005). Der Aspekt der Resistenzentwicklung und möglicherweise auch ökonomische Aspekte haben zur Entwicklung verschiedener Vakzinierungsmodelle gegen *H. pylori* am Tier und am Menschen geführt (Michetti *et al.* 1994, 1999; Radcliff *et al.* 1997; Ferrero *et al.* 1995; Marchetti *et al.* 1995; Gomez-Duarte *et al.* 1998; Del Giudice *et al.* 2001). Neben der klassischen Therapie könnte eine Vakzinierung gegen *H. pylori* einen neuen Therapieansatz darstellen (Kleanthous *et al.* 1998, Del Giudice *et al.* 2001; Aebischer *et al.* 2005). Ein wirksames Zielantigen für eine Vakzinierung scheint die Urease zu sein (Michetti *et al.* 1994; Ferrero *et al.* 1995; Gomez-Duarte *et al.* 1998). Die Anwendung einer oralen attenuierten Lebendvaccine, bestehend aus einer *H. pylori*-Urease-Untereinheit exprimierenden *Salmonella*, scheint eine wirksame Immunisierungsmethode darzustellen, da die *H. pylori*-Last damit um zwei logarithmische Größenordnungen reduziert werden kann. Eine Eradikation des Erregers wird aber durch eine Vakzinierung nicht immer erreicht (Ermak *et al.* 1998, Gomez-Duarte *et al.* 1998, Lucas *et al.* 2001). Dennoch ist die Entwicklung einer oralen Vakzine gegen *H. pylori* eine vielversprechende Möglichkeit, die momentan weiterentwickelt wird (Aebischer *et al.* 2005). Um den Einfluß der *H. pylori*-Infektion auf die Magenflora und einen möglichen Einfluß eines oralen Vakzins zu untersuchen, kam in dieser Arbeit eine *H. pylori*-Infektion im Mausmodell (Balb/c) zum Einsatz. Frühere kulturelle Analysen der Magenflora hatten einen Hinweis auf eine erhöhte bakterielle Diversität in *H. pylori*-infizierten Tieren gegenüber PBS-behandelten Kontrolltieren gegeben (T. Aebischer; persönliche Mitteilung). Um den relativen Anteil einzelner Bakterien an der Gesamt-Flora einschliesslich bisher nicht-kultivierbaren Bakterien darzustellen, wurde die Magenflora infizierter und nichtinfizierter, sowie immunisierter und nichtimmunisierter Tiere mit vergleichender Sequenzanalyse der 16S rRNA-Gene in Klonbibliotheken und mit quantitativer Echtzeit-PCR untersucht. Dabei sollten *H. pylori*-induzierte Änderungen und der Einfluss der Vakzinierung auf die Diversität der Magenflora analysiert werden. Für die Darstellung komplexer mikrobieller Gemeinschaften einschliesslich der bisher nicht-kultivierbaren Bakterienarten ist dies ein leistungsfähiger Ansatz (von Wintzingerode *et al.* 1997; Vaughan *et al.* 2000; Zoetendal *et al.* 2004ab).

1.5 Molekulargenetische Analyse der mikrobiellen Diversität in komplexen Habitaten

Die Bakteriengemeinschaften in komplexen Habitaten unterliegen stetigen Anpassungsprozessen (Übersichten dazu von: Hunter-Cevera 1998, Bull 2000). Der Gastrointestinaltrakt von Säugetieren stellt aufgrund seiner funktionellen und anatomischen Gliederung eine Vielzahl von Lebensräumen für Bakterien bereit. Die Aktivität und Zusammensetzung der Darmflora ist von vielen Parametern wie z.B. der

Verfügbarkeit von Substraten, dem pH-Wert, dem Redoxpotential oder dem Sauerstoffpartialdruck abhängig (Cummings *et al.* 1987). Von den dominanten Gruppen der menschlichen Darmflora gelten etwa 80% als bisher nicht kultivierbar. Ein wesentlicher Nachteil der kulturabhängigen Verfahren liegt sicher in der wechselseitigen physiologischen Abhängigkeit von Bakterien in einem komplexen Habitat (Hattori *et al.* 1997). Deshalb können mit kulturabhängigen Verfahren zwar weitreichende Aussagen zur qualitativen und quantitativen Zusammensetzung komplexer Florengemeinschaften getroffen werden, alleine sind sie aber möglicherweise nicht geeignet, um die Diversität eines Habitats komplett zu erfassen (Ward *et al.* 1990; Amann 1995, Torsvik *et al.* 1990ab, 1998; Torsvik & Oreas 2002; Dykhuizen 1998). Durch die Etablierung von kultivierungsunabhängigen Methoden konnten in den letzten Jahren viele bisher nicht kultivierbare Bakterienarten beschrieben werden. Einige Studien, die auf Sequenzanalysen des Gens für die bakterielle 16S rRNA basieren, schätzen den Anteil kultivierbarer Bakterien in diversen Habitaten sogar auf nur 0.1% der Gesamtpopulation (Hugenholtz *et al.* 1998ab, Ward *et al.* 1998, Dojka *et al.* 2000, DeLong & Pace 2001). Bakterien können anhand spezifischer Markermoleküle identifiziert und phylogenetisch klassifiziert werden. Über vergleichende Sequenzanalysen dieser Markermoleküle werden phylogenetische Zuordnungen getroffen (Altschul *et al.* 1997, Cole *et al.* 2006, Ludwig *et al.* 2004), wobei für molekulare Taxonomie von Bakterien z. B. Elongationsfaktoren, ATPasen, RNA Polymerase B (*rpoB*) und die 16S/23S rRNA angewendet werden (Ludwig *et al.* 1998). Die Arbeiten der letzten Jahre haben gezeigt, dass die *ssrRNA*-Sequenzen (16S für Prokaryoten, 18S für Eukaryoten) für die Taxonomie besonders geeignet sind, was zu einem schnellen Anstieg der 16S rRNA-Sequenzinformationen in Datenbanken geführt hat. In der Datenbank der Michigan State Universität („Ribosomal Database Project“, Cole *et al.* 2005, Version 9.44; 31.10.2006) sind momentan 273.300 Einzelsequenzen verzeichnet. Ausgangspunkt zur Herstellung repräsentativer 16S rRNA Klonbibliotheken ist die Extraktion genomischer DNA aus einer Mischprobe eines komplexen Habitats. Das Gemisch an 16S rRNA-Genen wird in einer Polymerasekettenreaktion mit eubakteriellen Konsensus-Primern amplifiziert (Weisburg *et al.* 1991), die Amplifikate in Vektoren ligiert und in *E. coli* transformiert. Die anschließende Sequenzanalyse redundanter Klonsequenzen kann mittels Hybridisierung gruppen-spezifischer rDNA-Oligonukleotidsonden (Liesack & Stackebrandt 1992, Moter *et al.* 1998) vereinfacht werden. Die Analyse der gastrointestinalen Flora bei Mensch und Tier basierend auf 16S rRNA-Gensequenzen wird seit einigen Jahren von verschiedenen Arbeitsgruppen angewendet (Zoetendal *et al.* 1998,2002ab; Leser *et al.* 2002, Eckburg *et al.* 2005, Bik *et al.* 2006; Sokol *et al.* 2006ab, Martinez-Medina *et al.* 2006; Übersichten dazu: Tannock 1999, 2001; Dahllöf 2002; Zoetendal *et al.* 2004ab, 2006). Zur Darstellung der bakteriellen Diversität zu einem bestimmten Zeitpunkt in einem definierten Abschnitt werden Methoden genutzt, die einen sogenannten „Fingerprint“, einen genetischen Fingerabdruck erstellen (Muyzer & Smalla 1998; Vaughan *et al.* 2000;

Konstantinov *et al.* 2002). Dazu gehören die Denaturierende--Gradienten-Gelelektrophorese (DGGE, Muyzer *et al.* 1993), Temperatur Gradienten, die Temporäre Temperatur Gelelektrophorese (TGGE/TTGE, Muyzer & Smalla 1998), die Einzelstrang-Konformationspolymorphismus Detektion (SSCP, Lee *et al.* 1996), die amplifizierte rDNA-Restriktionsanalyse (ARDRA, Massol-Deya *et al.* 1995) oder die zufallsmedierte Amplifikation von DNA-Polymorphismen (RAPD, Xia *et al.* 1995). Bei der DGGE ist im Gegensatz zur Klonbibliothek kein Klonierungsschritt erforderlich. Es handelt sich um eine Methode, bei der 16S rRNA-Amplifikate in einem Polyacrylamidgel mit denaturierendem Gradienten elektrophoretisch aufgetrennt werden. Neben den kulturellen Verfahren haben auch biochemische und molekularbiologische Identifizierungsverfahren Limitationen. Mögliche Fehlerquellen liegen z.B. in der Kontamination von Probenmaterial, der DNA-Extraktion, der Primerauswahl für die PCR, der Bildung von Sequenzchimären (von Wintzingerode *et al.* 1997, Zoetendal *et al.* 2001) und in der Kombination von PCR und Klonierungsschritten zur Erstellung von 16S rRNA Klonbibliotheken (von Wintzingerode *et al.* 1997, Leser *et al.* 2002). In Bakterien können ausserdem mehrere unterschiedliche Kopien des 16S rRNA Moleküls vorliegen (Nübel *et al.* 1996) und die Menge der 16S rRNA bzw. die Menge an Ribosomen pro Zelle hängt von der Bakterienspezies und von der Wachstumsphase ab.

1.6 Fragestellungen

Da die Aufklärung der Rolle von Komponenten des angeborenen Immunsystems und von definierten Bakterienarten der Darmflora bei CED im Mittelpunkt dieser Arbeit stand, wurden Ileitis und Colitis in gut etablierten Mausmodellen untersucht, die sowohl die Analyse der Darmflora als auch die Untersuchung immunologischer Parameter unter gut kontrollierten, definierten Bedingungen erlaubten. Zunächst wurden molekulare Wechselwirkungen zwischen Darmbakterien und Komponenten des angeborenen Immunsystems in Tieren untersucht, die eine normale Darmflora besitzen, denen aber bestimmte Gene der angeborenen Immunität fehlen. Parallel sollte der Einfluss der Darmflora auf entzündliche Prozesse in keimfreien Tieren analysiert werden, die mit definierten Bakterienarten assoziiert wurden. Schliesslich ermöglichte die Gabe gereinigter TLR-Liganden die Feststellung, welche bakteriellen Komponenten auf Molekülebene Darmentzündung auslösen. Bei der *H. pylori*-induzierten Veränderung der Mausmagenflora, sollte die Frage beantwortet werden, wie sich die *H. pylori*-Infektion auf die Diversität der Magenflora auswirkt und wie eine orale Immunisierung mit einer attenuierten *Salmonella*-Lebendvaccine gegen *H. pylori* die Magenflora beeinflusst.

Ziele der vorliegenden Arbeit:

- Feststellung des Einflusses des angeborenen Immunsystems auf die Ausbildung einer normalen Darmflora.
- Feststellung des Einflusses des angeborenen Immunsystems auf die Entzündung im Ileum und im Colon.
- Erkennung von Veränderungen der Darmflora während der Entzündungsprozesse.
- Definition des Beitrags der gesamten Darmflora bzw. definierter Bakterienarten zu den CED-assoziierten Entzündungsreaktionen.
- Identifikation von Bakterien-Zellwandbestandteilen (TLR-Liganden), die Darmentzündung auslösen.
- Erkennung und Beschreibung der Magenflora nach *H. pylori* Infektion bei Balb/c Mäusen.
- Beschreibung des Einflusses einer oralen Lebendvakzine gegen *H. pylori* auf die Florendiversität im Magen.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Chemikalien und Reagenzien

Tab. 1: Verwendete Chemikalien und Herstellerangaben

Substanz	Hersteller / Zulieferer
Agar-Agar	Roth, Karlsruhe
Agarose	Roth
Ammoniumchlorid	Roth
Ammoniumperoxodisulfat	Sigma-Aldrich
Ampicillin (als Zusatz bei Klonierungsexp.)	Sigma-Aldrich
Ampicillin (zur Generierung gnotobiotischer Tiere)	Ratiopharm
Borsäure	Riedel-de Haen
Bromphenolblau	Bio-Rad, München
Ciprofloxacin	Bayer Vital
Desoxyadenosintriphosphat (dATP)	Roche, Mannheim
Desoxycytidintriphosphat (dCTP)	
Desoxyguanosintriphosphat (dGTP)	
Desoxythymidintriphosphat (dTTP)	
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Merck, Darmstadt,
CSPD: Dinatrium-3-(4-methoxyspiro{1,2-doxetan-3,2'(5'chloro)tricyclo[3.3.1.1 ^{3,7}] decan}-4-yl)-phenylphosphat	Roche
Dextransulfat 40 kDa	ICN Biochemicals, Irvine, CA, USA
Eisessig (glacial)	Merck
Ethanol	JJ Baker, Deventer
Ethylendiamintetraessigsäure	Roth
Formaldehyd	
Formamid deionisiert	
Glycerin	
Halothan	Eurim-Pharm, Mülheim
Harnstoff	Roth
Hefeextrakt	
Imipinem	MSD
Isoamylalkohol	Sigma-Aldrich

IPTG: Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid	Sigma-Aldrich
Kaliumdihydrogenphosphat	Merck
Maleinsäure	Roth
Metronidazol	Fresenius
Natriumchlorid	Roth
Natriumcitratdihydrat	Roth
Natriumdodecylsulfat	Roth
Natriumjodid	Roth
Natriumlaurylsarkosin	Roth
N-(1-Naphthyl) ethylendiamindihydrochlorid	Sigma
Phenol (Roti-Phenol)	Roth
Rapid Gel XL 40%	USB, Cleveland
RNAlater	Qiagen, Hilden
Silbernitrat	Roth
Silika Matrix	Sigma-Aldrich
Sulfanilamid	Roth
SYBR Green I	Fluka
TEMED: N,N,N,N-Tetramethylethylendiamin	Roth
TMB: 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin	Sigma-Aldrich
TRIzol Reagenz	Invitrogen
Trichloromethan (Chloroform)	Merck
Trypton / Pepton aus Casein	Merck
Vancomycin	Cell Pharm
Xylencyanol FF	Bio-Rad
X-Gal: 5-Brom-4-chlor-3-indoxyl-β-D-galactopyranosid	Sigma-Aldrich
Zirkonium-Silika-Perlen (0,1 mm)	Biospec

2.1.2 Geräte, kommerzielle „Kits“ und andere Materialien

Tab. 2: Verwendete Geräte und Materialien

Gerätebezeichnung	Hersteller
Horizontale Gel Elektrophorese	PeqLab
DCode Universal Mutation Detection System	Bio-Rad
DGene	

Biofuge fresco	Heraeus Instruments
Eppendorf 5415C	Eppendorf, Hamburg
Eppendorf 5436	Eppendorf
Vacuum Zentrifuge	Heraeus Instruments
CEQ™8000 Genetic Analysis System	Beckman Coulter, Krefeld
T3 Thermocycler	Biometra, Göttingen
FastPrep FP120	Bio101
Power Supply Model200	Bio-Rad
HAT Multitron	Infors AG
GeneGenius	Syngene, Cambridge
Anthos BSK Bench	Anthos, Köln
Micro-4 Dot Blot Oven	MWG Biotech
Microprocessor pH meter ph3000	WTW
SpectraFluor Plus	Tecan
Anaerobier-Töpfe	Oxoid, Wesel
AnaeroGen-Beutel	Oxoid
Anaerotest	Merck
GelBond PAG Film	Biozym, Hessisch-Oldendorf

Tab. 3: Verwendete kommerzielle „Kits“

Kitbezeichnung	Hersteller
QIAmp DNA Mini Kit	Qiagen
QIAmp DNA Stool Kit	Qiagen
QIAquick PCR Purification Kit	Qiagen
RNeasy Mini Kit	Qiagen
QIAquick Gel Extraction Kit	Qiagen
Invisorb Spin Plasmid Mini Kit	Invitek, Berlin

GFX™MicroPlasmidPrep Kit	Amersham Biosciences, München
DTCS™Quick Start Kit	Beckman Coulter
CleanSEQ®	Agencourt, USA
OptEIA Set Mouse IFN-gamma	B&D Biosciences, USA
TA Cloning® Kit	Invitrogen, Groningen
TOPO TA Cloning® Kit	Invitrogen
DIG Luminescent Detection Kit	Roche
API 32 A Rapid	bioMérieux, Nürtingen
API 10S	
Api 50 CHL	

2.1.3 Puffer und Lösungen

Tab. 4: Verwendete Puffer und chemische Lösungen

Puffer / Lösung	Zusammensetzung
Agarosegel	1.5 g Ficoll, 25 mg Bromphenolblau, 25 mg Xylen Cyanol FF, Aqua dest. auf 10 mL
Probenpuffer	
Anti DIG AP	1% Blocking Reagenz, 9 mL Maleinsäurepuffer
Konjugat	2 µL Anti DIG AP (Anti Digoxigenin alkalische Phosphatase)
Blocking Reagenz	10% Blocking Reagenz [Roche, Mannheim] in Maleinsäure, pH 8.0
CSPD Substrat	12 µL CSPD / 10 mL Detektionspuffer
Lysis-Puffer	10 mM Tris pH 8.0 (Salzsäure), 150 mM Natriumchlorid, 20 mM EDTA; 1% SDS, Aqua dest auf 100 mL
Färbelösung	1 g Silbernitrat, 3.5 mL 37% Formaldehyd, Aqua dest auf 1000 mL
Entwickler	67.4 g Natriumcarbonat-Decahydrat, 1 mL 2% Natriumthiosulfatlösung (w/v), 3.5 mL 37% Formaldehyd, Aqua dest auf 1000 mL
Detektionspuffer	0.1 M Tris-Salzsäure, pH 9.5 0.1 M Natriumchlorid
Maleinsäure-Puffer	0.1 M Maleinsäure, 0.15 M Natriumchlorid , pH 7.5
Phosphat gepufferte	8 g Natriumchlorid, 0.2 g Kaliumchlorid,
Salzlösung (PBS)	1.44 g Natriumhydrogenphosphat, Aqua dest. auf 1000 mL, pH 7.4
PCR-Puffer (10x)	100 mM Tris-Salzsäure, pH 8.3, 500 mM Kaliumchlorid
Kaliumphosphat-Puffer	23.14 g Kaliumdihydrogenphosphat, 164.38 g Kaliumhydrogenphosphat , Aqua dest. auf 1000 mL

Polyacrylamidgel (für DGGE)	21 g Harnstoff, 5 mL Rapid Gel XL (40%), 6 mL 10x TBE , 500 µL DMSO, Aqua dest. auf 50 mL: Polymerisierung mit 292 µL APS (10%), 30 µL TEMED
Silika-Suspension	2.5 g Silika, 25 mL 6M Natriumjodid
Silika Wasch-Puffer	50 mM Natriumchlorid, 10 mM Tris, 2.5 mM EDTA, 50% Ethanol (v/v), pH 7.5
SSC Puffer (20x)	175.3 g Natriumchlorid, 88.2 g Natriumcitratdihydrat, Aqua dest. auf 1000 mL, pH 7.0
Stammlösung (0%)	I 50 mL RapidGel XL (40%), 2.5 mL TAE (50x), 5 mL Glycerin, Aqua dest auf 250 mL
Stammlösung (100%)	II 105.4 g Harnstoff, 100 mL Formamid, 50 mL RapidGel XL (40%), 2.5 mL TAE (50x), 5 mL Glycerin, Aqua dest auf 250 mL
Standard Hybridisierungs- Puffer	5x SSC, 0.1% Natriumlaurylsarkosin, 0.02% SDS, 1% Blocking Reagenz
Stop Puffer	9.5 mL Formamid, 0.4 mL EDTA (500 mM), 5 mg Bromphenolblau, 5 mg Xylencyanol FF, 0.1 mL Aqua dest.
Stripping Solution	0.2 N Natronlauge, 0.1% SDS
TAE Puffer (50x)	242 g Tris-Base, 57.1 mL Essigsäure, 100 mL 500 mM EDTA, Aqua dest. auf 1000 mL
TBE Puffer (10x) (für Agarosegele)	108 g Tris-Base, 27.5 g Borsäure, 7.3 g EDTA, Aqua dest. auf 1000 mL
TE Puffer	0.01 M Tris-Salzsäure, pH 7.6, 1 mM EDTA
Wasch Lösung 1	0.1 x SSC, 0.1% SDS
Wasch Lösung 2	6 x SSC, 0.1% SDS

2.1.4 Oligonukleotidprimer und -sonden

Tab. 5: M13-Primer, RAPD-PCR Primer und DIG-markierte Sonden

Primer-Name	Sequenz 5´-3´	Orientierung
M13 -20	GTAAAACGACGGCCAGT	F
M13 -40	GTTTCCAGTCACGAC	F
M13 reverse	AACAGCTATGACCATG	R
Sonden-Name	Sequenz 5´-3´	16S Position
Lac-141	DIG-GACTGGGATAACACCTG	141-157
Hpy-1	DIG-CACACCTGACTGACTATCCCG	585-605
Primer-Name	Sequenz	
10bp Nowruz	GTGATCGCAG	entfällt

Alle Oligonukleotidprimer oder Sonden wurden, sofern nicht anders angegeben, durch TIB MOLBIOL (Berlin) hergestellt.

Tab. 6: 16S rRNA PCR-Primer

Primer-Name	Sequenz 5´-3´	16S Position	Orientierung
		(<i>E.coli</i> Zählung)	
TPU1 / 8f	AGAGTTTGATCMTGGCTCAG	8:27	F
TPU2	CCARACTCCTACGGGAGGCA	334:353	F
TPU3	CAGCKGCCCGGTAATWC	519:536	F
TPU4	GGATTAGATACCCTGGTAGTCC	785:805	F
TPU5	AAACTYAAKGAATTGACGG	907:926	F
TPU6	GGGCMACACACGTGCTACAAT	1220:1240	F
RTU2	TGCCTCCCGTAGGAGTYTGG	353:334	R
RTU2A	CTGCTGCCTCCCGTAGGAGT	357:338	R
RTU2B	CTGCCTCCCGTAGGAGT	354:338	R
RTU3	GWATTACCGCGGCKGCTG	536:519	R
RTU5	CCGTCAATTCMTTTRAGTTT	926:907	R
RTU6	ATTGTAGCACGTGTGTMGCCC	1240:1220	R
RTU7	ACAAGRCCCGGGAACGTATT	1393:1373	R
RTU8	AAGGAGGTGATCCANCCRCA	1541:1522	R
1513r/ rp2	ACGGCTACCTTGTACGACTT	1513:1492	R
1510r/1492r	GGTACCTTGTACGACTT	1510:1492	R
16S-1410r	CGGTGTGTACAAGACCC	1410	R
516f	TGCCAGCAGCCGCGGTA	516:532	F
16S Lac138+	AGAGATCGGGATAACACCTG	138-157	F
16S 968F	AACGCGAAGAACCTTAC	968-84	F
16S 1378R	CGGTGTGTACAAGGCCCGGGAACG	1401-1378	R
16S 968F-GC	CGCCCGGGGCGCGCCCCGGGCGGGGCGGGGGCACGGGGG AACGCGAAGAACCTTAC		F+GC
HDA1	ACTCCTACGGGAGGCAGCAGT	339-360	F
HDA2	GTATTACCGCGGCTGCTGGCAC	539-518	R
HDA1GC	CGCCCGGGGCGCGCCCCGGGCGGGGCGGGGGCACGGGGG ACTCCTACGGGAGGCAGCAGT		F+GC

2.1.5 DNA-Längenmarker, Enzyme, Plasmide, Zellen

Tab. 7: Verwendete DNA Längenmarker, Enzyme, Plasmide, Zellen

Produktbezeichnung	Hersteller
Gene Ruler 50 bp DNA Ladder (0,5 µg/µl)	Fermentas, St. Leon-Rot
Gene Ruler 100 bp DNA Ladder Plus	
Gene Ruler 1 kb DNA Ladder (0,5 mg/ml)	
Lambda DNA/EcoRI+HindIII Marker 3 (0,5 mg/ml)	
Ampli Taq DNA Polymerase	Applied Biosystems, PE
Pfu Turbo Cx DNA Polymerase	Stratagene
Proteinase K	Roth
Lysozym	Fluka
pCR 2.1 [®] Plasmid	Invitrogen, Groningen, Niederlande
pCR 2.1 [®] TOPO [®] Plasmid	
<i>E.coli</i> TOP10F ⁺ [®]	

2.1.6 Mäusstämme

Tab. 8: Verwendete Versuchstiere mit Bezeichnung

Bezeichnung	Wildtypstamm	Kreuzungsstatus Dezember 2003
LBP (^{-/-})	Balb/c	Inzucht 100%
Balb/c	Balb/c	Inzucht 100%
C57BL/10	C57BL/10 ScSn	Inzucht 100%
C57BL/6	C57BL/6J	Inzucht 100%
TLR4 (^{-/-})	C57BL/10 ScN	Inzucht 100%, natürlicher TLR4 Defekt
TLR2/TLR4 (^{-/-})	C57BL/10 ScSn/ScN	TLR2-KO 6x auf C57BL/10 ScN rückgekreuzt
TLR2 (^{-/-})	C57BL/10 ScSn	TLR2-KO 6x auf C57BL/10 ScSn rückgekreuzt

Alle Tiere mit Ausnahme C57BL/6 und Balb/c wurden freundlicherweise von Prof. Dr. Marina Freudenberg, MPI für Immunbiologie Freiburg i.Br. zur Verfügung gestellt.

2.1.7 Nährmedien und biochemische Leistungsprüfung

Tab. 9: Verwendete Fest- und Flüssigmedien zur Bakterienkultivierung

Name	Firma / Art.Nr.	Einsatzbereich
Columbia 5% SB-Agar	Oxoid, PB5039A	Nährreiches Grundsubstrat, das ein maximales Wachstum von Mikroorganismen ermöglicht
MacConkey Nr.3	Oxoid, PO5002A	Selektiv für Gram-negative Stäbchen, enthält Laktose: Bildung von Acetaldehyd durch laktosespaltende Bakterien: → rote Kolonien z.B. <i>E.coli</i> laktosenegative Bakterien: → helle, transparente Kolonien z.B. <i>Proteus</i> sp.
Columbia Agar für Anaerobier (Kanamycin/Vancomycin)	Heipha, Dr.Müller GmbH, 382e	Selektiv für Anaerobier; hemmt das Wachstum von aeroben Bakterien
Acid-Agar	Nährbodenküche der Med. Mikrobiologie, Charité CBF	Selektiv für Gram-positive Kokken, Äsculinspaltung → Schwarzfärbung
CNA 5% SB IMPRO	BD, 257306	Gram-positive Kokken
Rogosa-Agar	Merck, 1.05413.0500	Selektiv für Gram-positive LAB*
Hirn-Herz-Glucose Bouillon	Oxoid, CM0225B	Flüssigvollmedium (Anreicherungsmedium)
Thioglykolat Bouillon	Oxoid, CM0173T	Flüssigvollmedium
MRS Bouillon	Sigma, 69966	Flüssigmedium für Milchsäurebakterien
Luria Bertani Agar (LB)	Nährbodenküche der Med. Mikrobiologie, Charité CCM	Vollmedium 10 g Trypton, 5 g Hefeextrakt, 10 g Natriumchlorid, 15 g Agar Agar, ad 1000 mL Aqua dest
LAXI Agar LB Agar mit Ampicillin, X-Gal und IPTG	Nährbodenküche der Abt. Med. Mikrobiologie, Charité CCM	Vollmedium mit Antibiotikum und X-Gal / IPTG; Blau-Weiss-Musterung transformierter <i>E. coli</i> Klone, wie LB: bei 50°C Zugabe +250 µL Ampicillin (200 mg/mL) +200 µL X-Gal (40 mg/ml) +50 µL IPTG (100 mM)

*LAB = Lactic acid bacteria = Milchsäurebakterien

2.2 Versuchstiere

2.2.1 Mausstämme und Genotypisierungen

Die TLR-defizienten und LBP^{-/-} Tiere wurden freundlicherweise aus der Zucht vom Max-Planck-Institut für Immunbiologie (Prof. Marina Freudenberg, Freiburg im Breisgau) zur Verfügung gestellt. C57BL/10ScSn (Wildtyp, Poltorak *et al.* 1998, 2001), TLR2^{-/-} (C57BL/10ScSn sechsmal rückgekreuzt mit den TLR2^{-/-} von Tularik Inc., San Francisco, USA), C57BL/10ScN (C57BL/10ScN trägt eine natürliche homozygote Deletion im TLR4-Gen) und TLR2^{-/-} + TLR4^{-/-} doppeldefiziente Tiere, wobei C57BL/10ScN sechsmal auf TLR2^{-/-} rückgekreuzt waren (Vogel *et al.* 1979; Merlin *et al.* 2001; Werts *et al.* 2001; Lembo *et al.* 2003). Die LBP^{-/-} Tiere hatten einen Balb/c Hintergrund und trugen eine *neo*-Insertion im LBP-Gen (Jack *et al.* 1997). Der Balb/c-Mausstamm, der für die *H. pylori*-Vakzinierungsstudien verwendet wurde, stammte aus dem Bundesinstitut für Risikobewertung (BfR, ehemals BgVV, Berlin). Alle Mausstämme, die für die Untersuchung der Ileitis und Colitis (einschliesslich der Stämme C57BL/6 und NMRI) eingesetzt wurden, waren am Forschungsinstitut für Experimentelle Medizin (Berlin) gezüchtet worden. Alle Experimente wurden den Bestimmungen des deutschen Tierschutzgesetzes entsprechend durchgeführt. Die Genotypisierungen der TLR-defizienten Tiere, sowie der LBP^{-/-} wurden durch PCR nach Angaben der Züchter bzw. Hersteller durchgeführt (Primersequenzen und PCR-Konditionen siehe Anhang Tabellen D-G;).

2.2.2 Haltungsbedingungen

Die TLR^{-/-}- und Wildtyp-Mäuse wurden im Forschungszentrum für Experimentelle Medizin in Berlin-Steglitz unter spezifisch-pathogenfreien (SPF) Bedingungen gehalten. Je nach Gruppengröße wurden Makrolonkäfige der Typen Typ II und III verwendet. Als Einstreu und Futter kamen ssniff 3/4 Faser und jeluxyl 300/500 und ssniff-V1120M-Z, ssniff-V1530R/M-H (ssniff Spezialdiäten GmbH, Soest, D) in Pelletform als Trockenfutter zum Einsatz. Die Tiere erhielten einmal wöchentlich sterilisiertes Trockenfutter und frisches Leitungswasser. Die Käfige wurden einmal wöchentlich gewechselt. Die abiotischen Faktoren in den Räumen waren: 55-60% relative Luftfeuchte bei 21°C und 12/12-Stunden Hell/Dunkelrhythmus.

2.3 Tierversuche

2.3.1 Induktion einer Ileitis durch orale *T. gondii*-Infektion

Die für die Induktion der Ileitis notwendigen *T. gondii*-Zysten wurden zunächst in NMRI-Mäusen generiert, die keine Ileitis entwickelten, und welche die akute Phase der Infektion überlebten. Nach intraperitonealer Infektion mit 10 Zysten von *T. gondii* (Stamm ME49) entwickelten die NMRI-Mäuse eine chronisch-progrediente Enzephalitis. Die Parasiten gelangten ins zentrale Nervensystem und in die quergestreifte Muskulatur. Sie verbleiben dort lebenslang als Bradyzoiten in Zysten. Nach etwa zwei bis drei Monaten konnten aus den Gehirnen dieser Tiere Zysten für die Ileitis-Induktion bei suszeptiblen Tieren entnommen werden. Am Tag der Infektion der C57BL-Mäuse wurden die Gehirne der NMRI-Tiere entnommen, in PBS suspendiert, die Anzahl der Zysten ermittelt und auf das gewünschte Volumen von 0,3 mL PBS eingestellt. Für die Induktion einer *T. gondii*-induzierten Ileitis wurden suszeptiblen C57BL/6-Mäusen bzw. C57BL/10 oder TLR2^{-/-}, TLR4^{-/-}, TLR2+4^{-/-}-Mäusen 100 Zysten von *T. gondii* (Stamm ME49) in 0,3 mL PBS oral per Gavage verabreicht. Diese Infektion löste eine akute terminale Ileitis aus (nach Liesenfeld 2002).

2.3.2 Induktion der Colitis mit DSS

Für die Induktion der Colitis erhielten die Versuchstiere im Trinkwasser gelöstes DSS (3,5% w/v) über einen Zeitraum von sieben Tagen. Dies verursachte eine akute Colitis. Die Probennahme erfolgte am Tag acht, einen Tag nach Absetzen des DSS. Die Trinkmengen wurden täglich kontrolliert.

2.3.3 *Salmonella enterica* als orale Lebendvakzine gegen *H. pylori*

Im Rahmen einer präklinischen Studie über Vakzinierungsstrategien gegen *H. pylori* wurde in Kooperation mit dem Max-Planck-Institut für Infektionsbiologie (Dr. Toni Aebischer, Prof. T.F. Meyer, Berlin) die Magenflora in Balb/c-Mäusen mittels molekulargenetischer Methoden untersucht. Es wurde eine prophylaktische perorale Immunisierung mit dem attenuierten *Salmonella enterica* serovar typhimurium Stamm SL3261 durchgeführt, der die *H. pylori* Urease-Untereinheiten UreA und UreB von dem Plasmid pYZ97 überexprimiert. Für die Immunisierung wurden einmalig ca. 5×10^9 KBE *Salmonella*, suspendiert in 100 μ L PBS, peroral verabreicht. Die so immunisierten Tiere wurden nach vier Wochen mit dem Streptomycin-resistenten *H. pylori* Stamm P76 infiziert (1×10^9 KBE) oder mit PBS behandelt (nach Gomez-Duarte *et al.* 1998; Lucas *et al.* 2001). Acht bis neun Wochen nach der *H. pylori*-Infektion wurden die Mägen entnommen und eine molekulargenetische Analyse der Magenflora durchgeführt. Die Daten wurden ergänzt durch kulturelle Bestimmungen der *H. pylori*-Last, histologische Untersuchungen der mukosalen Gewebeintegrität und Messungen des gastrischen pH (Aebischer *et al.* 2006).

2.3.4 Übersicht zum Ablauf der Probennahme bei Ileitis und Colitis

Im Verlauf der Ileitis wurden die Tiere täglich gewogen und Aussehen und Verhalten beurteilt. Bei der DSS-Colitis wurden täglich Beurteilungen mehrerer klinischer Parameter durchgeführt (nach Siegmund *et al.* 2001). Am Sektionstag wurden die Mäuse mittels Inhalationsnarkose mit dem Narkotikum Halothan® getötet. Nach einer Ganzkörperdesinfektion im Ethanolbad wurde das Bauchfell steril eröffnet. Durch den noch verschlossenen Situs erfolgte eine kardiale Blutentnahme mit steriler Spritze. Aus dem Blut wurde eine Blutkultur (Thioglykolatmedium) zur Überprüfung von ins Blut translozierten Bakterien angelegt. Der Rest des kardialen Vollblutes wurde der Gewinnung von Serum zugeführt. Das Serum wurde zur Bestimmung von Immunmediatoren gewonnen. Nach der Eröffnung des Bauchraumes durch einen Y-förmigen Schnitt wurden zunächst Stücke von der Leber und Milz sowie die mesenterialen Lymphknoten unter sterilen Bedingungen entnommen und in eine Organkultur zur Bestimmung von Immunmediatoren überführt. Danach erst erfolgte die Präparation des Intestinums. Für die Analyse der ilealen Darmflora wurde (meist flüssig-halbfester) Darminhalt des terminalen Ileums (ca. 1 cm Länge) in ein 2 mL Eppendorfgefäß gefüllt mit 1.5 mL PBS überführt. Beim Colon hingegen wurde eine geformte Fäzeskugel oder flüssiger Fäzes aus einem möglichst entzündeten Abschnitt entnommen oder von dort, wo Fäzes zu gewinnen war. Aus diesem Material wurden Bakterien für eine qualitative sowie quantitative Analyse auf Festmedien ausgebracht und die Gesamt-DNA-Extrakte dienten als Basis für die nachfolgenden molekulargenetischen Analysen. Weiteres Gewebe vom terminalen Ileum bzw. Colon wurde für Organkultur, für Gewebeschnitte und zur RNA-Isolierung gewonnen. Unter der Sektion erfolgte eine Beurteilung der Organe bezüglich morphologischen Aspekten, Volumen-/Größenänderungen, Einblutungen, Stenosen sowie Stuhlkonsistenz. Als Marker für den Entzündungsgrad wurde die relative Verkürzung der Darmlänge gewählt. Dabei wurde die Dünndarmlänge von Magenausgang bis zum Caecum gemessen und das Colon vom Caecumende bis zum Anus. Die relative Verkürzung des Dünndarms bzw. Dickdarms wurde wie folgt kalkuliert: Relative Verkürzung in Prozent = $\frac{\text{Mittelwert Darmlänge am Tag null} - \text{Mittelwert der Darmlänge am Tag acht p.i. (bzw. nach Absetzen des DSS)}}{\text{Mittelwert Darmlänge Tag null}} \times 100$.

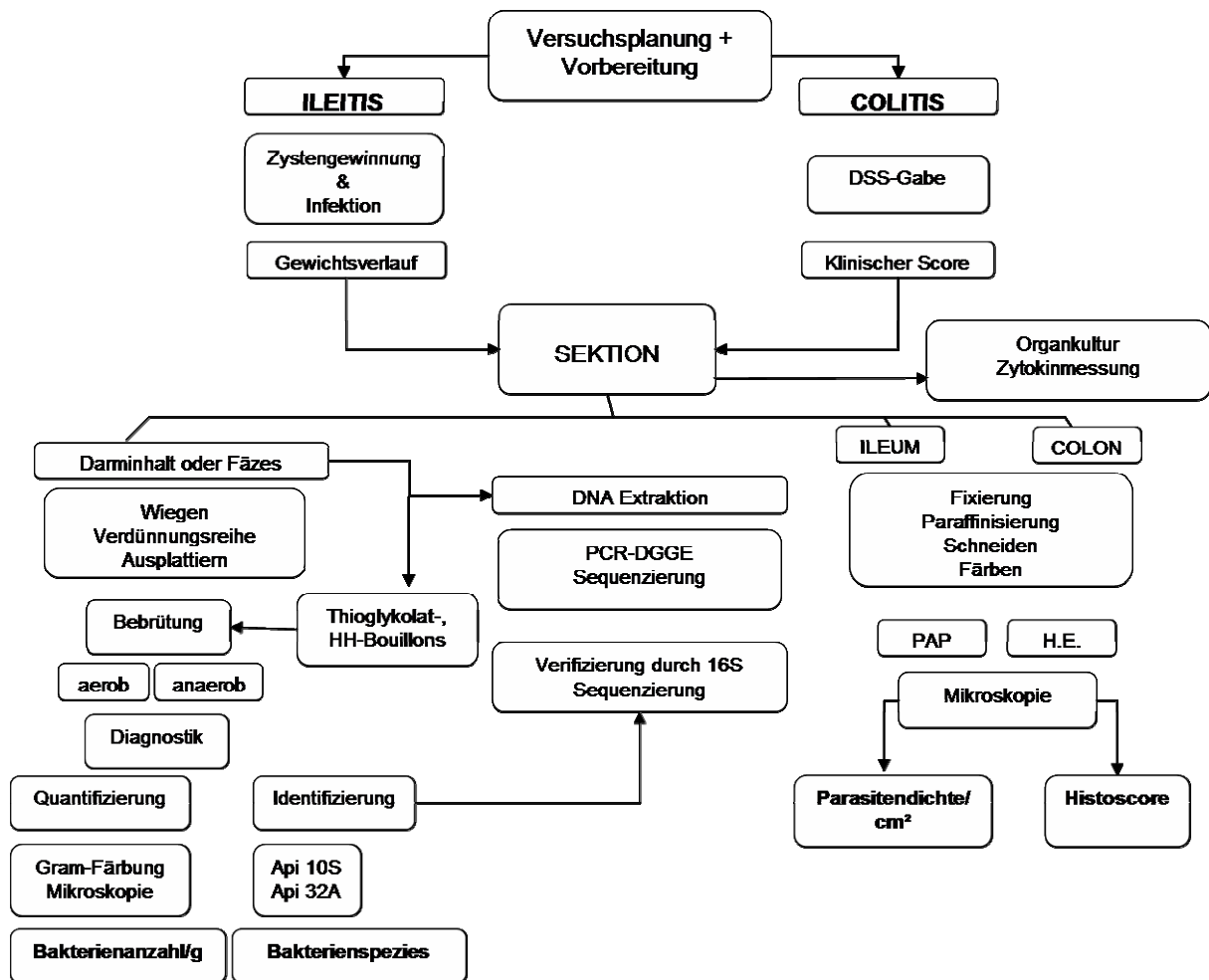


Abb. 5: Versuchsvorbereitung, Probennahme und Auswertung bei der *T. gondii*-induzierten Ileitis und DSS-Colitis (Modifiziert nach Julia Niebergall, medizinische Dissertationsschrift).

2.3.5 Beurteilung von Histopathologie in Ileum und Colon

Die Histopathologie und die Parasitenlast wurden in Gewebestücken aus dem terminalen Ileum bzw. Colon ermittelt, die in 5% Formalin fixiert und in Paraffin eingebettet worden waren. Zur Beurteilung der Histopathologie im Ileum oder Colon wurden Mikrotom-Schnitte (5 µm) mit Hämatoxylin und Eosin (HE) gefärbt, im Lichtmikroskop untersucht und ein standardisiertes histologisches Punktesystem von null bis sechs angewandt. Bezüglich des Entzündungsprozesses wurden folgende Punktwerte vergeben: null = normal; eins = ödematös, Veränderungen in den Zotten; zwei = intraluminaler Exkretion von Transsudat, aber intaktes Epithel; drei = intraluminales Abschlüpfen von Epithelzellen; vier = beginnende Epithelauflösung; fünf = Mukosazerstörung <50% der Ileumlänge; sechs = transmurale Zerstörung >50% Ileumlänge, schwere Nekrose). Die Analyse erfolgte in einer geblindeten Untersuchung durch zwei Untersucher (MMH und DF). Bei der DSS-Colitis wurde zusätzlich zur Histopathologie ein klinischer Index erhoben (nach Siegmund *et al.* 2001), der von null bis zwölf reichte. Es wurden Gewichtsverlust, Blut im Stuhl und die Stuhlkonsistenz beurteilt. Die Punktwerte für Gewichtsverlust waren (Gewichtsverlust in % / Punktwert): 0-5% / 0; 5-10% / 1; 10-15% / 2; 15-20% / 3; >

20% / 4. Die Punktwerte für Blut im Stuhl (Hämoccult): negativ / 0; positiv / 2; makroskopisch / 4. Für die Stuhlkonsistenz wurden folgende Punkte vergeben: normal oder hart / 0; weich / 2; am Anus klebend oder flüssig / 4.

2.3.6 Beurteilung der Parasitenlast

Zur Beurteilung der Parasitenlast im Ileum wurden parasitenhaltige Vakuolen mit *T. gondii*-Tachyzoiten oder Tachyzoiten-Antigen immunhistologisch über *T. gondii*-Antiserum in 2 Feldern eines zufällig gewählten Darmstücks einer Darmrolle (1 cm) mit PAP-Färbung (Peroxidase-Antiperoxidase) sichtbar gemacht und gezählt. Die Angabe erfolgte in Anzahl der Tachyzoiten pro Zentimeter Darmrolle. Die Auswertung der Gewebeschnitte erfolgte durch MMH und DF.

2.3.7 Kulturelle Analyse der Bakterienflora

Der Darminhalt des terminalen Ileums (ca. 1 cm) wurde in PBS resuspendiert und gewogen. Nach einer seriellen Verdünnung wurden 100 µL Aliquots auf Agarmedien (Oxoid) bei 37°C für 48 Stunden aerob und für fünf Tage anaerob kultiviert. Die Gesamtzahl der Kolonien wurde auf Columbiablut-Agar ermittelt. Gallensalz-Aesculin und McConkey-Agar wurden zur quantitativen Analyse von Enterokokken bzw. Enterobakterien benutzt. Die Anzahl der Milchsäurebakterien wurde auf Rogosa-Agar (Merck) bestimmt. Zur differenzierten Analyse der anaeroben Flora wurden Columbia-Festmedien mit Kanamycin-Vancomycin eingesetzt. Die Anzahl von Gram-positiven und Gram-negativen Bakterien wurde über das Auszählen verschiedener Koloniemorphotypen auf Columbiablut-Agar bestimmt. Die Bakterien wurden subkultiviert und durch Gram-Färbung und biochemische Leistungsprüfung mit den API-Systemen API20E für die Enterobakterien, API50CH für die Laktobazillen und API Rapid ID32A für obligate Anaerobier (Biomérieux) weiter untersucht. Die Ergebnisse wurden als koloniebildende Einheiten (KBE) pro Gramm Darminhalt dargestellt. Die kulturellen Analysen wurden in Kooperation mit MMH, David Fuchs und Julia Niebergall (beide cand. med.) durchgeführt.

2.3.8 Antibiotische Behandlung der Ileitis

Zur prophylaktischen oder therapeutischen Behandlung der *T. gondii*-induzierten Ileitis erhielten die Mäuse die Antibiotika Ciprofloxacin und / oder Metronidazol (50 mg/kg KG/Tag in PBS) peroral über Gavage zweimal am Tag. Zur prophylaktischen oder therapeutischen Behandlung der *T. gondii*-Ileitis wurde zum anderen der nicht resorbierbare LPS-Antagonist Polymyxin B (Euro OTC Pharma, Kamen) eingesetzt. Die Gabe erfolgte in der Dosierung 50 mg/kg KG/Tag (in PBS) peroral über Gavage zweimal am Tag. Um direkte Wechselwirkungen der Antibiotika mit den Parasiten zu vermeiden, wurden diese 24 Stunden vor und nach der Parasitengabe abgesetzt. Bei der prophylaktischen und therapeutischen Behandlung wurden Antibiotika entweder fünf Tage vor bzw. nach der Parasiteninfektion verabreicht.

2.3.9 Herstellung gnotobiotischer Mäuse, definierte Rekolonisierung und Gabe von *E. coli* Lipid A

Um die kultivierbare Darmflora vollständig zu eradizieren, wurden mindestens acht Wochen alte Mäuse in sterile Käfige transferiert. Sie erhielten einen Cocktail aus Ampicillin (1g/l, Ratiopharm), Vancomycin (500 mg/l, Cell Pharm), Ciprofloxacin (200 mg/l, Bayer Vital) Imipenem (250 mg/l, MSD) und Metronidazol (1 g/l, Fresenius) im Trinkwasser *ad libitum* über einen Zeitraum von sechs bis acht Wochen (nach Rakoff-Nahoum *et al.* 2004, modifiziert). Die Abwesenheit kultivierbarer Bakterien wurde wöchentlich und nach Sektion durch Inkubation von Fäzesproben über mindestens sieben Tage bei 37°C in den Flüssigmedien Hirn-Herz-Bouillon und Thioglykolat (Oxoid) mit anschließender Trübungsmessung beurteilt. Die Abwesenheit kultivierbarer Bakterien wurde auch mikroskopisch in Gram-gefärbten Fäzesproben und Darminhalt überprüft. Bei sichtbarer Trübung der Anreicherungsmedien wurden diese auf Agarmedien aerob und anaerob kultiviert und mikroskopisch und biochemisch beschrieben. Die so generierten gnotobiotischen Mäuse ohne kultivierbare Darmflora wurden definiert rekolonisiert mit: lumenalem Ileuminhalt von Tieren mit Ileitis, *E. coli*, einer Mischung von strikt anaeroben Bakterien, bestehend aus *Bacteroides/Prevotella* spp., oder *Lactobacillus johnsonii* durch orale Gavage von 0,3 mL Suspension an drei aufeinanderfolgenden Tagen. Vier Tage vor den Rekolonisierungsexperimenten wurde der Antibiotikacocktail abgesetzt und durch steriles Trinkwasser ersetzt. Vier Tage nach der dritten Gabe von Ileuminhalt oder Bakteriensuspension wurden die Tiere mit *T. gondii* infiziert, um eine Ileitis zu induzieren. Zur Gewinnung von Darminhalt aus kranken Tieren wurde der Ileuminhalt von fünf C57BL/6-Tieren am Tag acht p.i. an drei aufeinanderfolgenden Tagen gewonnen. Der Ileuminhalt wurde in 2,5 mL PBS gepoolt und jeweils 0,3 mL pro Versuchstier peroral verabreicht. *E. coli* und *Bacteroides/Prevotella* spp. wurden aus dem Darminhalt Ileitis-kranker Tieren isoliert, *L. johnsonii* aus einem gesunden Kontrolltier. Alle Isolate wurden biochemisch und über vergleichende 16S rRNA Analyse identifiziert. *E. coli* und *L. johnsonii* wurden in Hirn-Herz-Bouillon kultiviert. *L. johnsonii* und *E. coli* wurden nach Zentrifugation in sterilem PBS gewaschen und in 5 mL PBS resuspendiert (0,3 mL / Tier perorale Gavage). Eine Mischung aus obligat anaeroben Gram-negativen Stäbchen Bakterien *Bacteroides uniformis*, *B. ovatus*, *B. thetaiotaomicron*, *Prevotella buccae*, *P. oralis* wurde in Thioglykolat-Medium kultiviert. Die Isolate wurden auf einen McFarland-Wert von sechs eingestellt (ca. 10^9 – 10^{10} KBE/mL). Um oxidativen Stress für die anaeroben Bakterien zu vermeiden, wurden die Flüssigkulturen hier nicht zentrifugiert, sondern in einem Endvolumen von 5 mL gepoolt und verabreicht, wie oben beschrieben. Die Bakterienkonzentrationen wurden durch quantitative Kultivierung auf Agarmedien bestimmt. Für die Behandlung mit *E. coli* LPS erhielten die gnotobiotischen Mäuse ab Tag sechs vor der *T. gondii*-Infektion 15 µg/mL Lipid A des *E. coli*-Stamms R515 (Nr. ALX-581-200-L002, Axxora Life Sciences, Grünberg) im autoklavierten Trinkwasser (bis Tag

neun p.i.).

2.3.10 Statistik

Soweit nicht anders angegeben erfolgte die statistische Signifikanzberechnung von Mittelwerten und Standardabweichungen mit dem T-Test (Students t-Test). Die Signifikanzniveaus sind mit Sternen gekennzeichnet, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ und *** $p < 0.001$.

2.4 DNA-Isolierung und Polymerasekettenreaktion

2.4.1 Isolierung von DNA

Für die Extraktion bakterieller Gesamt-DNA aus unterschiedlichen Probenmaterialien kamen Standard-DNA-Verfahren zum Einsatz. Die kommerziellen Verfahren wurden je nach Probeneigenschaften gezielt ausgewählt.

Tab. 10: Methoden für die Extraktion von DNA aus verschiedenen Probenmaterialien

Probenmaterial	Kitbezeichnung / Extraktionsmethode				
	QIAmp DNA Stool Kit	QIAmp DNA Mini Kit	Phenol- Chloroform	Invisorb Spin Plasmid Kit	GFX™Micro Plasmid Prep Kit
Fäzes	X				
Darminhalt			X		
Darmgewebe			X		
Bakterienisolate		X	X		
Plasmid DNA				X	X
Mausschwanz		X			
Mausmagen		X			

Enzymatisch-mechanische Extraktion von DNA mit Phenol-Chloroform

Nach Sektion der inneren Organe (siehe 2.3.4; Abb.6) wurde der Darminhalt aus Ileum oder Colon in 1 mL PBS resuspendiert. Die Suspensionen wurden zentrifugiert (20 min bei 16.000 x g), der Überstand entfernt und das „Pellet“ in 500 µL Lysispuffer resuspendiert. Die enzymatische Lyse erfolgte nach Zugabe von 20 µL Proteinase K (20 mg/mL) durch einstündige Inkubation bei 56°C. Um auch Zellwände Gram-positiver Bakterien aufzuschliessen, wurde das Lysat mit 150 µL Phenol, 150 µL CI-Lösung (Chloroform:Isoamylalkohol 24:1; v/v) und 0,3 g Zirkonium-Silika-Perlen versetzt. Nach der mechanischen Behandlung (3 x 30 s auf Stufe 5,5) im Homogenisator (FastPrep FP120) folgte eine Zentrifugation (5 min bei 16000 x g). Die DNA-haltige wässrige Phase wurde anschliessend mit CI-Lösung zweimal gewaschen. Nach DNA-Fällung mit 0,1 Volumenteilen Natriumacetat (3 M) und 2,5 Volumenteilen Ethanol (-20°C über Nacht) erfolgte eine Zentrifugation (20 min bei 16000 x g). Das DNA-Pellet wurde zweimal mit Ethanol (70% v/v) gewaschen, in einer Vakuumzentrifuge getrocknet und anschließend in 300 µL TE-Puffer resuspendiert. Die Lagerung der extrahierten DNA erfolgte bei -20°C.

Thermische Lyse von Bakterien

Für die Freisetzung von DNA aus anaeroben Gram-negativen Bakterienisolaten wurde eine Kolonie vom Festmedium abgenommen und in 250 µL PBS suspendiert. Nach dreimaligem Aufkochen (98°C/10 min) und Tiefkühlen (-20°C) wurden die Lysate kurz anzentrifugiert. Die DNA im Überstand wurde direkt für die Amplifikation im PCR-Reaktionsansatz verwendet (1 µL).

Isolierung von DNA mit dem QIAmp-DNA-Stool-Kit

Für die molekulare Analyse der Bakterienflora aus Fäzesproben wurde das „QIAmp-DNA-Stool-Kit“ verwendet. Mögliche PCR-Inhibitoren, die im Fäzes in hoher Konzentration enthalten sein können, sollen durch dieses „Kit“ reduziert werden. Die Extraktion erfolgte nach dem Protokoll des Herstellers.

2.4.2 Amplifikation der bakteriellen 16S rRNA-Gene

Für die spezifische Amplifikation von DNA des 16S rRNA-Gens von Bakterien wurde die Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR; Mullis & Faloona, 1987) verwendet. Da die hitzestabile Taq-DNA-Polymerase aus *Thermophilus aquaticus* (AmpliTaq DNA Polymerase, Applied Biosystems) keine „Proofreading“-Aktivität hatte, wurde den Reaktionsgemischen für die PCR Pfu-DNA-Polymerase (im Verhältnis 10 (Taq) / 1 (Pfu)) beigemischt, die bei identischem Temperaturoptimum (72°C) „Proofreading“ katalysiert. Die Amplifikation der 16S rRNA-Gene unter Standardbedingungen wurde in 50 µL Reaktionsgemisch (2 mM MgCl₂; 1,25 mg BSA; 0.5 µM Primer TPU1; 0.5 µM Primer (RTU8); 200 µM dNTPs; 5.0 U AmpliTaq DNA Polymerase, 0.5 U Pfu Turbo Cx DNA Polymerase, Stratagene) im T3 Thermocycler durchgeführt. Nach einer initialen Denaturierung bei 98°C für 3 min wurde die Amplifikation (29mal: 93°C/1 min; 56°C/1 min; 72°C/3 min) durchgeführt. Nach einer abschliessenden Elongation für 7 min bei 72°C wurden die PCR-Produkte elektrophoretisch aufgetrennt.

2.4.3 Klonierung der amplifizierten 16S rRNA

Die durch PCR amplifizierten 16S rRNA-Gene der Bakterien, die aus dem Mausmagen oder dem Maudarm isoliert worden waren, wurden mit dem „TOPO-TA-Cloning®-Kit“ und dem „TA-Cloning®-Kit“ gemäß den Angaben des Herstellers kloniert. Die zu klonierenden PCR-Produkte wurden durch eine präparative Agarosegelelektrophorese gereinigt und mit dem „QiaQuick-Gel-Extraction-Kit“ aus dem Gel eluiert. Die PCR-Produkte wurden mit den Plasmid-Vektoren pCR®2.1 / pCR®2.1-TOPO® ligiert und in *E. coli* TOP10F' transformiert. Die transformierten Zellen wurden auf LAXI-Agar kultiviert (37°C, ü.N.) und im Anschluss einem Blau-Weiss-„Screening“ unterzogen. Nach einmaliger Überimpfung und Kultivierung weißer, positiver Kolonien auf LAXI-Agar wurde mit 1 µL Zellysat einer weissen Kolonie die Insertlänge in den rekombinanten Plasmiden mittels PCR durchgeführt. Dazu wurde die in die Plasmide inserierte bakterielle DNA mit den zu

den flankierenden Plasmidbereichen komplementären Primern M13(-20) und M13 Reverse in 25 µL Reaktionsgemisch unter Standardbedingungen (siehe 2.4.2) amplifiziert.

2.4.4 Isolierung der bakteriellen Plasmid-DNA

Für die Präparation der Plasmid-DNA wurden die transformierten Bakterien aus je einer weissen Kolonie auf LAXI-Festmedium in 1 mL LB-Medium mit Ampicillin (50 µg/mL) bei 37°C über Nacht kultiviert. Die Isolierung und Aufreinigung der Plasmid-DNA erfolgte mit dem „Invisorb Spin Plasmid Mini Kit“ oder dem „GFX™ Micro Plasmid Kit“ gemäß der Herstellerangaben. Die isolierten Plasmide wurden elektrophoretisch aufgetrennt und im UV-Licht analysiert.

2.4.5 Reinigung und Überprüfung der PCR-Produkte

Silika-Reinigung

Die Menge der verwendeten Reagenzien für die Silika-Aufreinigung (Boyle & Lew, 1995) wurde proportional an das Volumen des PCR-Reaktionsgemischs angepasst. Einem Standard-PCR-Volumen von 50 µL wurden 90 µL Natriumjodidlösung (6M) und 7 µL Silika-Suspension zugegeben und 10 min bei RT geschüttelt. Nach einminütiger Zentrifugation bei 16.000 x g wurde der Überstand verworfen. Das Pellet wurde zweimal mit Silika-Waschpuffer gewaschen. Die Elution der DNA erfolgte mit 50 µL TE-Puffer bei 50 °C für 10 Minuten. Nach Zentrifugation für 1 min bei 16.000 x g wurde die DNA-haltige Überstand abgenommen. Die gereinigten PCR-Produkte wurden anschließend in einem Agarose-Gel auf die erwartete Grösse hin überprüft.

Photometrische Bestimmung der DNA-Konzentration

Zunächst wurden von der zu bestimmenden DNA-Lösung Verdünnungen in Wasser oder Elutionspuffer hergestellt. Durch Absorptionsmessung bei 260 und 280 nm sowie durch Berechnung des Verhältnisses OD260/OD280 waren Rückschlüsse auf die Reinheit der Nukleinsäurelösungen möglich.

Agarosegel-Elektrophorese für DNA und PCR-Produkte

Die qualitative Kontrolle der PCR-Produkte und DNA-Extrakte erfolgte durch Auftrennung eines Gemisches aus je 5 µL Amplifikat oder 1 µL DNA-Extrakt und 3-5 µL Agarosegel-Probenpuffer in einem horizontalen Agarosegel (0.8% – 4% je nach Amplikongrösse variierend). Zur Anfärbung der Nukleinsäuren wurde 1 µL Ethidiumbromidlösung (10 mg/mL) zu 100 mL heißer, flüssiger Agarose-Lösung gegeben. Die Trennung erfolgte bei 10 V/cm in 1x TBE. Die DNA-Banden in den Gelen wurden anschließend im UV-Licht sichtbar gemacht und mit dem „GeneGenius“-System ausgewertet und dokumentiert.

2.5 Denaturierende Gradienten-Gel-Elektrophorese

Mit Hilfe der DGGE kann die bakterielle Diversität komplexer Habitate dargestellt werden. Wenn die durch PCR amplifizierten 16S rRNA-Gene aus einem Bakteriengemisch in einem denaturierenden Polyacrylamidgel mit Harnstoff-Formamid-Gradienten elektrophoretisch aufgetrennt werden, dann ist die Anzahl der resultierenden Banden zur Komplexität der Population proportional. Das Trennprinzip beruht auf sequenzabhängigen Unterschieden in den Schmelzpunkten der 16S rRNA-Gene. Die Primer 16S 968F-GC und 16S 1378R (modifiziert nach Nübel *et al.* 1996; Tab.6) binden unabhängig von der Bakterienart in hochkonservierten Sequenzabschnitten des 16S rRNA-Gens und flankieren die variablen Regionen 6 bis 8 (V6-V8). Das resultierende Amplikon ist 400 Basenpaare (Bp) groß. Die Primer HDA1GC (Walter *et al.* 2000, 2001) und HDA2 binden in Sequenzabschnitten, welche die variablen Regionen V2-V3 des 16S rRNA-Gens flankieren. Die Amplifikate sind hier 200 Basenpaare gross. Die Primer 16S 968F-GC und HDA1GC tragen am 5'-Ende eine GC-reiche Sequenz, die 40 Bp lang ist. Diese wirkt wie eine Klammer und hält die denaturierten Amplifikate an einem Ende zusammen. Dadurch wird die Bremswirkung der Denaturierung auf die Laufgeschwindigkeit verstärkt. Für die PCR-basierte DGGE-Analyse der Bakterien in der Magen- oder Darmflora der Maus wurden Teile der bakteriellen 16S rRNA-Gene aus 20-100 ng Gesamt-DNA in 50 µL PCR-Puffer mit 2,5 mM MgCl₂, 200 mM dNTPs, 0,3 µM GC-Klammer-Primer 1, 0,3 µM Primer 2, 400 ng BSA, 5 Units Taq-DNA-Poymerase und 0,5 Units Pfu-Polymerase amplifiziert. Die Reaktionsbedingungen für die unterschiedlichen Amplikons sind in Tabelle 11 zusammenfassend dargestellt.

Tab. 11: 16S rRNA PCR-DGGE Reaktionsbedingungen (T3 Thermocycler)

Primerkombination	PCR Schritt	Zeitdauer	Temperatur
16S 968F-GC / 16S 1378R	Initiale Denaturierung	7 min	95 °C
	Denaturierung	30 s	93 °C
	Primeranlagerung	1 min	60 °C
	Strangverlängerung	1 min	72 °C
	Finale	30 min	72 °C
HDA1GC / HDA2	Initiale Denaturierung	2 min	94 °C
	Denaturierung	30 s	94 °C
	Primeranlagerung	1 min	61 °C
	Strangverlängerung	1 min	72 °C
	Finale	30 min	72 °C

2.5.1 Herstellung der Gele für die DGGE

Der denaturierende, chemische Gradient aus Harnstoff und Formamid wurde mit einem Gradientenmischer Model 475 nach Angaben des Herstellers (Bio-Rad, München) hergestellt. Die Gele wurden auf eine Trägerfolie gegossen (GelBond®). Die jeweilige Gradientengebrauchslösungen wurden aus den Stammlösungen I (0%) und II (100%) hergestellt. Stammlösung I hat 0% und Stammlösung II (40% Formamid, 7M Harnstoff) 100% denaturierende Eigenschaften. Die Fragmente wurden in dem 8%igen Polyacrylamidgel in 0,5x TAE Puffer aufgetrennt. Die Elektrophorese erfolgte entweder in einer „DCode“ oder in der „DGene“ Apparatur bei 60°C. Amplikons, die mit den Primern 16S 968F-GC und 16S 1378R (Tab. 6) hergestellt worden waren, wurden in einem Gradienten von 35-60% bei 80V für 16 Stunden aufgetrennt. Amplikons, die mit den Primern HDA1GC-HDA2 hergestellt worden waren, wurden in einem Gradienten von 35-50% bei 130V für 5,5 Stunden aufgetrennt.

2.5.2 Färbung von DNA

Nach der Elektrophorese wurden die aufgetrennten 16S rRNA-Teilgene der Bakterien durch Silberfärbung als Banden im Gel sichtbar gemacht. Bei der Silberfärbung wurden die Gele 30 min in Ethanol / Essigsäure (30% / 10% v/v) fixiert. Nach einer Sensitivierung mit Ethanol (30%) zweimal für 30 min, erfolgten fünf Waschschrte (10 min) mit Aqua dest. Nach Einwirkung der Färbelösung für 30 min erfolgte die manuelle Entwicklung und das Abstoppen der Färbereaktion mit Essigsäure (30%). Nach Abtropfen der Essigsäure wurden die Gele in Folie eingeschweisst und bei Raumtemperatur dunkel gelagert. Zur Auswertung der Banden wurden die Gele digitalisiert.

2.5.3 DGGE-Bandenisolierung und direkte Sequenzierung

Um die aufgetrennten 16S rRNA-Teilgene Bakterienarten zuordnen zu können, wurde eine Sequenzanalyse der DNA aus den DGGE-Banden durchgeführt. Die Elution von Amplifikaten aus silbergefärbten DGGE-Gelen erwies sich als wenig praktikabel und führte oft zu negativen Ergebnissen bei der darauf folgenden Reamplifikation. Aus diesem Grund wurden die Gele stattdessen für 20 min mit SYBR Green I (10 µL 10.000fach Konzentrat auf 100 mL Aqua dest.) gefärbt. Unter UV-Licht wurden Gelbanden mit einem sterilen Skalpell ausgeschnitten und in 100 µL Aqua dest. über Nacht bei 37°C geschüttelt, so dass die Amplifikate in Lösung gehen konnten. Diese eluierten Amplifikate dienten als Vorlage für die Reamplifikation unter Standardbedingungen mit den Oligonukleotiden 16S 968F und 16S 1378R (Tab. 6). Die resultierenden Amplifikate wurden mit dem Primer 16S-968F sequenziert. Waren in einer DGGE-Bande 16S rRNA-Gene von mehreren Bakterienarten vorhanden, war eine eindeutige phylogenetische Zuordnung nur nach einer Klonierung der Reamplifikate möglich (siehe 2.4.3).

2.6 DNA Sequenzierung

2.6.1 Identifizierung von Bakterienisolaten

Ausgewählte Bakterienisolate: *E. coli*; *Bacteroides/Prevotella* sp., *Enterococcus* sp., *Lactobacillus* sp. u.a. wurden zusätzlich zu der biochemischen Leistungsprüfung (siehe 2.3.7) anhand ihrer 16S rRNA Sequenzen phylogenetisch identifiziert. Dazu wurden die kompletten 16S rRNA-Gene mittels PCR mit den Primern TPU1/RTU8 (Tab.6) aus isolierter DNA oder aus Lysaten amplifiziert und sequenziert. In der Regel wurde der Primer TPU1 für die Sequenzierung verwendet. Üblicherweise reichte eine Teilsequenz von ca. 500 Bp für die Identifizierung der Bakterienarten durch Vergleich mit Sequenzen in Datenbanken aus (siehe 2.6.3). In einzelnen Fällen wurden auch Sequenzen der kompletten 16S rRNA-Gene (ca. 1500 Bp) generiert.

2.6.2 Sequenzanalyse von 16S rRNA-Genbibliotheken


Als Sequenziervorlage dienten entweder Plasmid-DNA, oder die 16S rRNA „Inserts“ wurden zunächst mit Hilfe der vektorspezifischen Primer M13(-20) und M13 Reverse unter Standardbedingungen amplifiziert (siehe 2.4.2). Als Amplifikationsvorlage wurden jeweils 0,5 µL der jeweiligen Plasmid-Präparation bzw. 1 µL PCR- Produkt verwendet. Die PCR-Produkte (siehe 2.6.1), die als Vorlage für die Sequenzierung dienten, wurden mit dem „QIAquick PCR Purification Kit“ nach Angaben des Herstellers gereinigt. Für die Sequenzierung der 16S rRNA kamen die vektorspezifischen Primer M13(-20) und M13-Reverse sowie bakterienspezifische Primer (siehe Tab.5/6) zum Einsatz. Alle Reaktionen wurden mit dem „DTCS™ Quick Start Kit“ durchgeführt. Ein Reaktionsansatz (20 µL) enthielt 4 µL Master Mix, 100 fmol aufgereinigtes PCR-Produkt bzw. aufgereinigte Plasmid-DNA, 1,6 µM Primer und Aqua dest ad 20 µL. Nach einer initialen Denaturierung bei 95°C für 5 min wurden die Sequenzierreaktionen (29mal: 95°C/20 s; 58°C/30 s; 72°C/1 min) im T3 Thermocycler durchgeführt. Die Produkte wurden mit dem „CleanSEQ® Kit“ gereinigt und in Formamid resuspendiert. Die Sequenzierung erfolgte im CEQ™8000-Gerät bei einer Kapillartemperatur von 50°C. Einer initialen Denaturierung (90°C für 120 Sekunden) folgte die Injektion bei 2.0 kV für 15 Sekunden und einer Separation bei 4.0 kV für 110 Minuten. Die Separation erfolgte in LPA I Gel (GenomeLab™).

2.6.3 Phylogenetische Einordnung der bakteriellen 16S rRNA-Sequenzen

Für die Auswertung der Sequenz-Rohdaten wurde die CEQ™8000-Software verwendet. Nach qualitativer Überprüfung der Chromatogramme wurden die 16S rRNA-Gensequenzen im FASTA-Format mit den in öffentlichen Datenbanken (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>; <http://rdp.cme.msu.edu/seqmatch>) hinterlegten Sequenzen verglichen. Bei unsicherer taxonomischer Zuordnung wurden die nächsthöheren Taxa angegeben.

2.7 Identifikation von 16S rRNA-Genen in Klonbibliotheken durch Hybridisierung

Aufgrund der abundanten Kolonisierung des Mausmagens durch *Lactobacillus*-Arten sollte zur Redundanzvermeidung in der anschliessenden Sequenzierung der 16S rRNA-Gene eine Vorauswahl der Klonsequenzen getroffen werden. Analog zur bereits beschriebenen Vorgehensweise bei den Klonbibliotheken (siehe 2.6.2) wurde zum Durchmustern der Klonbibliotheken die Plasmid-DNA der betreffenden klonierten 16S rRNA-Gene mit Hilfe des GFX™ Plasmid-Präparationskits präpariert. Nach Amplifikation mit vektorspezifischen Primern M13(-40) und M13 reverse wurden die Amplifikate, welche die 16S rRNA-Gensequenzen beinhalten, auf positiv geladenen Nylon-Membranen durch Bestrahlung mit UV-Licht (250nm, 5 min) immobilisiert. Die Hybridisierung erfolgte bei 55°C mit der Digoxigenin-(DIG)-markierten Sonde Lac-141 (5' DIG-GACTGGGATAACACCTG-3' (siehe Tab.5), welche für die 16S rRNA von *Lactobacillus gasseri/johnsonii* spezifisch ist. Die Spezifität wurde durch Hybridisierung der 16S rRNA aus Referenzstämmen (*L. gasseri*, *L. johnsonii* und andere *Lactobacillus*-Arten) überprüft. Die Sonde hybridisierte nicht mit den 16S rRNA anderer Bakteriengattungen (Abb.7; Kontrollblot). Als Dot-Blot-Spezifitätskontrollen wurden Referenz-16S rRNA PCR-Produkte von *L. gasseri* DSM 20243, *L. gasseri* Klon C5-4, *L. acidophilus* DSM 20079, *L. johnsonii* DSM 10533, *L. delbrückii* DSM 20074, *L. reuteri* Klon B6-62, *L. murinus* Klon C5-65, *Klebsiella planticola* DSM 3069, *Bifidobacterium longum* DSM 20219, *Clostridium xylanolyticum* DSM 6555, *Bacteroides vulgatus* DSM 1447, *H. pylori* (Klinisches Isolat), *H. pylori*, *Helicobacter* sp. und *H. hepaticus* (aus Klonbibliothek identifiziert) verwendet. Klone, die 16S rRNA-Sequenzen von *H. pylori* enthielten, wurden mit der Digoxigenin-markierten Sonde Hpy-1 (5' DIG-CACACCTGACTGACTATCCCG-3' (Trebesius *et al.* 2000) detektiert. Die 16S rRNA-Gensequenzen, die mit keiner der beiden Sonden detektiert werden konnten, wurden mit den Primern 1513r und RTU5 ansequenziert, deren Bindestellen die variablen Regionen V6 und V8 der 16S rRNA flankieren.



KM Lac 141					
1	X	2	X	1	L. gasseri DSM 20243
3		4	X	2	L. gasseri Klon C5-4
5		6		3	L. acidophilus DSM 20079
7		8		4	L. johnsonii DSM 10533
9		10		5	L. delbrückii DSM 20074
11		12		6	L. reuteri Klon B6-62
13		14		7	L. murinus Klon C5-65
15		16		8	Leer
				9	Klebsiella planticola DSM 3069
				10	Klebsiella planticola DSM 3069
				11	Bifidobacterium longum DSM 20219
				12	Bifidobacterium longum DSM 20219
				13	Clostridium xylanolyticum DSM 6555
				14	Clostridium xylanolyticum DSM 6555
				15	Bacteroides vulgatus DSM 1447
				16	Bacteroides vulgatus DSM 1447

Abb. 6: Kontrollhybridisierungen mit der für *Lactobacillus gasseri/johnsonii*-spezifischen (DIG)-markierten Sonde Lac-141 (Tab.5). Die Spezifität wurde durch Hybridisierung von 16S rRNA aus Referenzstämmen nachgewiesen (*L. gasseri*, *L. johnsonii* und andere *Lactobacillus* Arten, s. o.). Die Sonde hybridisierte nicht mit der 16S rRNA anderer *Lactobacillus*-Arten (5-7, Klonsequenzen identifiziert als *L. delbrückii*, *L. reuteri*, *L. murinus*) oder anderer nicht-*Lactobacillus* Arten (9-16, DSMZ Referenzstämmen).

Die Hybridisierung wurde, wie in Tabelle 12 dargestellt, durchgeführt. Modifikationen des Protokolls hinsichtlich Waschpuffer und -temperatur wurden für beide Sonden empirisch ermittelt. Für Hpy-1 wurde die Waschpufferkombination 1/2 (Tab.4) bei einer Waschttemperatur von 65°C verwendet. Bei Hybridisierung mit der Sonde Lac-141 kam die Waschpufferkombination 2/2 zum Einsatz, und die Waschttemperatur betrug 68°C. Der Nachweis der gebundenen DIG-markierten Oligonukleotide erfolgte mit Hilfe des „DIG-Luminescence-Detection-Kits“. Um eine erneute Hybridisierung der Membranen zu ermöglichen, wurden gebundene Oligonukleotide durch Waschen mit Stripping-Lösung (2 x 30 min bei 37°C) entfernt.

Tab. 12: Durchführung der Dot-Blot-Hybridisierung

Schritt	Reagenz/Puffer	Temperatur °C	Zeit min
Prähybridisierung	Prähybridisierungspuffer	54	30
Hybridisierung	Sonde (100µM) in Prähybridisierungspuffer	55	90
Waschen	Waschpuffer 1	Variabel	15
Waschen	Waschpuffer 2	Variabel	15
Spülen	Maleinsäurepuffer	37	3
Blockieren	Blockierungs-Reagenz 1%	37	30
Blockieren +Antikörper	Blockierungs-Reagenz 1% + 2µL Antikörper Anti-DIG AP	37	30
Spülen	Maleinsäurepuffer	37	15
Spülen	Maleinsäurepuffer	37	15
Detektion	Detektionspuffer + 10 µL Substrat CSPD	37	15

2.8 Quantitative Echtzeit-PCR der *Lactobacillus*-16S rRNA

Populationsänderungen der *Lactobacillus*-Arten wurden mit einer quantitativen Echtzeit-PCR (q-RT PCR; SYBR Green) in einem LightCycler™ Instrument quantitativ erfasst. Dazu wurden die 16S rRNA-Gene von *Lactobacillus*-Arten mit dem Primer 8f in Kombination mit einem *Lactobacillus*-spezifischen Primer 16S-Lac-138+ (siehe Tab.6) amplifiziert. Der Gehalt an eubakterieller 16S rRNA-Gene in den Proben wurde durch Amplifikation mit den Primern 8f und RTU2b (Tab.6) ermittelt, die unspezifisch an die 16S rRNA-Gene aller Bakterienarten binden. Der relative Anteil der *Lactobacillus*-16S rRNA-Gene in der Probe wurde über die Signalintensitäten der beiden Amplikons berechnet. Dabei wurde die Signalintensität des eubakteriellen rDNA Amplikons auf 100% gesetzt. Das PCR-Protokoll am LightCycler startete mit Denaturierung bei 95°C für 10 s, gefolgt von 30 Zyklen mit Hybridisierung bei 56°C/10 s und Elongation bei 72°C für 45 s. Die Datenauswertung erfolgte mit der LightCycler Software Version 3.5.3.

2.9 Typisierung von *E. coli*

2.9.1 Typisierung von Bakterienisolaten mittels RAPD-PCR

Ausgewählte *E. coli*-Isolate aus C57BL/6, BL/10 und TLR^{-/-}-Mäusen wurden mit der RAPD-PCR genotypisiert. In den RAPD-PCR-Analysen werden kurze Zufalls-Primer (meist 10 Nukleotide lang) als Startermoleküle in der PCR eingesetzt. Das Verfahren wird auch willkürlich gestartete PCR „Arbitrarily primed PCR“ (AP-PCR) genannt (Welsh & McClelland 1990). In der PCR wird in der Regel nur ein Primer eingesetzt. Die Differenzierung der *E. coli*-Isolate erfolgte mit dem Primer 10bp Nowruz (siehe Tab.5; Nowrouzian *et al.* 2003). Der PCR-Ansatz für die Genotypisierung aus 50 ng *E. coli*-DNA erfolgte in 50 µl PCR Puffer, 25 mM MgCl₂, 10 mM dNTP Mix, 25 µM 10 bp Nowruz und 5U/0,5U AmpliTaq/Pfu Turbo Cx DNA Polymerase. Die PCR Bedingungen für die RAPD-PCR waren wie folgt: Nach initialer Denaturierung (94°C 5 min) folgten 4 Zyklen (94°C/45 s, 30°C/120 s, 72°C/60 s). Darauf folgten 26 Zyklen bei 94°C über 5 s, 36°C/30 s und 72°C/30 s. Nach einer Endelongation bei 72°C für 10 min wurden die Produkte elektrophoretisch aufgetrennt. Die Elektrophorese erfolgte in einem 8%igen Polyacrylamid-Gel in 1x TAE Puffer bei 60°C, 130 V für 5,5 Stunden. Die RAPD-Bandenmuster wurden mit Silberfärbung sichtbar gemacht.

2.9.2 Pathotypisierung

Ausgewählte *E. coli*-Isolate aus dem Ileum von gesunden und von erkrankten Tieren mit Ileitis wurden auf das Vorhandensein von pathogen-assoziierten Genen untersucht. DNA-Extrakte aus *E. coli*-Isolaten wurden mit dem „QIAmp-DNA-Mini-Kit“ hergestellt und in die Medizinische Mikrobiologie der Medizinischen Hochschule Hannover (Dr. Florian Gunzer) versandt. Die Präsenz der Gene für die Shigatoxine (*stx1* und *stx2*) wurde dort mittels LightCycler™ untersucht (Pulz *et al.* 2003), die anderen pathogen-assoziierten Gene (*eaeA*, *hlyA*, *espA*, *katP*, *astA*) mit konventioneller PCR. Die *E. coli* DNA Integrität wurde mit Primern für die *E. coli*-Gene *tolC* und *recA* überprüft.

2.10 Analysen der RNA-Expression durch Hybridisierung von Microarrays

Ileumstücke von C57BL/10 ScSn Wildtyp- und TLR2^{-/-}- oder TLR4^{-/-}-Mäusen im gesunden Zustand und mit Ileitis (Tag acht p.i.) wurden mit der „Microarray“-Technik auf krankheits- und / oder TLR-abhängige spezifische Assoziationen hin untersucht. Für die Extraktion der Gesamt-RNA von ca. 1 cm Ileum kam der „RNeasy Mini Kit“ (Qiagen) zum Einsatz. Die Ileumstücke wurden nach der Sektion sofort in „RNAlater“ Stabilisierungsreagenz (Qiagen) überführt und bei -20°C gelagert. Die RNA-Isolierung erfolgte nach Protokoll des Herstellers und die RNA wurde bei minus 80°C eingefroren. Der Versand zum Helmholtz-Zentrum für Infektionsforschung (AG Mukosale Immunität) erfolgte auf Trockeneis. Die Analyse der RNA wurde in der „Array Facility“ der AG

Mukosale Immunität (Prof. Dr. Jan Buer) mit freundlicher Unterstützung durch Herrn Dr. Robert Geffers durchgeführt. Die Daten wurden im CCM Mitte ausgewertet. Die Qualität und Integrität der isolierten RNA wurde mit dem Agilent Technologies 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies; Waldbronn, Deutschland) überprüft. Für die Biotin-markierte Synthese ausgehend von 3 µg Gesamt-RNA wurden die Reaktionsgemische nach Standardprotokollen des Herstellers angesetzt (Affymetrix; Santa Clara, CA). 3 µg RNA wurde mit 100 pmol T7T23V Primer (Eurogentec; Seraing, Belgium) in doppelsträngige DNA umgeschrieben. Die cDNA wurde direkt in die *in vitro*-Transkriptionsreaktion in Anwesenheit von biotinylierten Nukleotiden eingesetzt. Die Konzentration der Biotin-markierten cRNA wurde über UV Absorption bestimmt. Es wurden stets 12,5 µg cRNA fragmentiert und mit einem Hybridisationsgemisch versehen, das vier biotinylierte Hybridisationskontrollen enthielt (BioB, BioC, BioD und Cre) wie vom Hersteller vorgeschlagen. Die Proben wurden auf einem „Affymetrix GeneChip“ für 16 Stunden hybridisiert, gewaschen und mit Streptavidin-Phycoerythrin (SAPE) gefärbt. Das Auslesen der Signale erfolgte mit einem „Affymetrix GeneChip Fluidic Station / Scanner“. Die Analyse der „Microarray“-Daten wurde mit dem Affymetrix GCOS 1.2 und dem „Data Mining Tool“ 3.1 Software Paket durchgeführt. Zur Normalisierung aller „Array“-Experimente wurde die Zielintensität auf 150 skaliert, ansonsten wurden die Standardeinstellungen der GCOS 1.2 benutzt. Die Auswertung der Daten erfolgte nach folgenden Kriterien: die Expressionsänderungen dargestellt als Signal log Verhältnis entweder als Anstieg der Expression „Increase“ (I) bzw. Abstieg der Expression „Decrease“ (D). Bei der Analyse der entzündungs-assoziierten regulierten Genexpression im Wildtyp BL10 wurden die korrespondierenden Werte für die TLR2- bzw. TLR4-defizienten Tiere mit angegeben (s. 3.1.6, Gesamttabellen A-C; Anhang). Für die TLR4-abhängige entzündungs-assoziierte Regulation wurden die Werte für Wildtyp und TLR2-/- mit der Bedingung: „No Change“ (NC; keine Änderung) gefiltert. Die Expressionsänderung wurde als Signal log Verhältnis (engl.: signal log2 ratio) dargestellt. Das bedeutet, dass bei einer Änderung um $\pm \log_2^1$ die Expression im Vergleich zur Grundlinie um den Faktor 2 erhöht oder erniedrigt war. Es wurden die Expressionsdaten am Tag acht (mit *T. gondii*-induzierter Ileitis) gegen Tag null (gesunder Zustand) von je einem Wildtyp, TLR2- bzw. TLR4-defizienten Tier analysiert.

2.11 Konzentrationsmessung von Immunmediatoren

Darmabschnitte (ca. 1 cm², 50-100 mg) wurden steril entnommen, längs aufgeschnitten, in PBS gewaschen und in Zellkulturschalen (24, Flachboden, Nunc) mit 500 µL serumfreiem RPMI-Medium unter Zugabe von 1% Penicillin/Streptomycin (1640, Gibco) für 18 Stunden bei 37°C inkubiert. Nach 24 Stunden wurde der Kulturüberstand abgenommen und bei -80°C gelagert. Die Interferon (IFN)-gamma- und Stickstoffmonoxid (NO)-Konzentrationen wurden mittels ELISA (BD Biosciences) bzw. mit der Griess-Reaktion (Green *et al.* 1982) bestimmt. Bei der Griess-Reaktion wurden 50 µL

Überstand (Medium) mit 50 µL 1,5% Sulfanilamid (Roth) in 1M HCl plus 0,15% N-(1-Naphthyl)ethylendiamindihydrochlorid (Sigma) gemischt. Nach 10 Minuten wurde die Absorption bei 540 nm photometrisch bestimmt. Die NO-Konzentrationen wurden über eine Standardkurve errechnet und auf Organgewicht und/oder Proteingehalt bezogen. Der ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) ist ein immunologisches Verfahren, mit dem einzelne Proteine über eine Antikörper-Antigen-Reaktion sensitiv und spezifisch nachgewiesen werden können. Soll ein bestimmtes Protein nachgewiesen werden, müssen die dazu passenden Antikörper bekannt sein und zuvor mit verschiedenen gentechnischen oder zellbiologischen Verfahren hergestellt worden sein. Hier kam das „Sandwich“-Verfahren zur Anwendung: Hierbei bindet ein spezifischer erster Antikörper („Capture Antibody“) am Boden einer Mikrotiterplatte (ImmunoMaxi, Biochrom). Nach dem Binden der Zielantigene im Probenmaterial wird ein zweiter Peroxidase-gekoppelter Antikörper hinzugefügt. Die Detektion erfolgt nach Umsetzung des Substrats (TMB) bei 450 nm im SpectraFluor Plus (Tecan). Die Messwerte wurden auf Gesamtproteingehalt und soweit verfügbar auf Organgewicht bezogen. Die Proteinbestimmung erfolgte nach der TCA-Methode (Sambrook *et al.* 1989).

3 Ergebnisse

3.1 Analyse der Darmflora bei *T. gondii*-induzierter Ileitis

3.1.1 Analyse der kultivierbaren planktonischen Ileumflora

Um die Darmflora zu charakterisieren, die im gesunden Ileum und im Ileum bei einer *T. gondii*-induzierten Ileitis vorlag, wurde eine umfangreiche qualitative und quantitative Analyse der kultivierbaren Darmflora durchgeführt. Sie sollte aufzeigen, welche Bakteriengruppen im gesunden und entzündeten Dünndarm in welcher Menge vorhanden waren. Durch diese detaillierte kulturelle Analyse konnten sowohl aerobe als auch anaerobe Bakterien isoliert und durch eine anschließende biochemische Leistungsprüfung bis zur Gattungs- bzw. Speziesebene identifiziert werden. Die Darmflora im gesunden Ileum setzte sich überwiegend aus Gram-positiven Bakterien der Gattungen *Lactobacillus*, *Clostridium*, *Eubacterium* und *Enterococcus* zusammen. Im gesunden Ileum waren aerobe Gram-positive Stäbchen mit $5,7 \pm 6,6 \times 10^8$ und Gram-positive Kokken mit $5,9 \pm 8,8 \times 10^6$ KBE/g Ileuminhalt nachweisbar. Der Anteil der anaeroben Gram-positiven Stäbchen betrug $1,1 \pm 0,9 \times 10^9$ KBE/g (Abb.7; Tab.13, 3.1.4). Im gesunden Ileum betrug dagegen der Anteil aerober Gram-negativer Stäbchen (*E. coli*) $7,2 \pm 9,0 \times 10^4$ KBE/g und anaerobe Gram-negative Stäbchen waren mit weniger als 1×10^3 KBE/g Ileuminhalt gerade noch nachweisbar. Während des Entzündungsprozesses nahm die Gesamtlast der Bakterien im Ileum von $1,6 \pm 0,8 \times 10^9$ KBE/g Darminhalt am Tag null, auf $2,3 \pm 2,5 \times 10^{11}$ KBE/g Darminhalt am Tag acht p.i. zu. Die Menge der aeroben Darmbakterien stieg von $5,8 \pm 6,6 \times 10^8$ auf $1,2 \pm 0,9 \times 10^{11}$ KBE/g und die Anzahl der anaeroben Darmbakterien nahm von $1,1 \pm 0,9 \times 10^9$ auf $1,1 \pm 1,8 \times 10^{11}$ KBE/g zu (Abb.7; Tab.13). In Mäusen mit akuter Ileitis (Tag acht p.i.) stieg der Anteil aerober bzw. anaerober Gram-negativer Stäbchen Bakterien, die als *E. coli* bzw. *Bacteroides/Prevotella* spp. identifiziert wurden, um sechs bis acht logarithmische Stufen an (Abb.7). Es wurden aerobe Gram-negative Stäbchen mit $1,2 \pm 0,9 \times 10^{11}$ und anaerobe Gram-negative Stäbchen mit $1,1 \pm 1,8 \times 10^{11}$ KBE/g Ileuminhalt nachgewiesen. Die Anteile an den strikt anaeroben Gram-negativen Bakterien betrugen für *Bacteroides* spp. 59,1% und für *Prevotella* spp. 40,9%. Die *Bacteroides*-Population setzte sich aus den Arten *B. ovatus* (61,5%), *B. merdae* (23,1%), *B. uniformis* (7,7%) und *B. thetaiotaomicron* (7,7%) zusammen. Die *Prevotella*-Population setzte sich aus den Arten *P. oralis* (88,9%) und *P. buccae* (11,1%) zusammen. Das Überwuchern des Ileums mit Gram-negativen Bakterien begann am Tag sechs p.i., als die *E. coli*-Last bzw. *Bacteroides/Prevotella* spp. innerhalb von 24 Stunden von $1,0 \pm 1,7 \times 10^7$ auf $6,3 \pm 4,8 \times 10^9$ KBE/g für *E. coli* und von weniger als 1×10^3 auf $6,7 \pm 7,8 \times 10^8$ KBE/g bei *Bacteroides/Prevotella* spp. anstieg. Im Verlauf der Entzündung nahm der Anteil der Gram-positiven Stäbchen, Laktobazillen und Clostridien, dagegen ab (Abb.7). Es konnten $5,5 \pm 4,1 \times 10^5$ KBE/g aerobe Gram-positive Stäbchen, $6,8 \pm 6,6 \times 10^8$ KBE/g aerobe Gram-positive Kokken und weniger als 1×10^3

KBE/g Ileuminhalt Gram-positive anaerobe Stäbchen nachgewiesen werden. Bei den Enterokokken bestehend aus den Arten *E. faecalis*, *E. faecium* und *E. gallinarum* war im Verlauf der Entzündung eine nicht signifikante Anstiegstendenz zu beobachten.

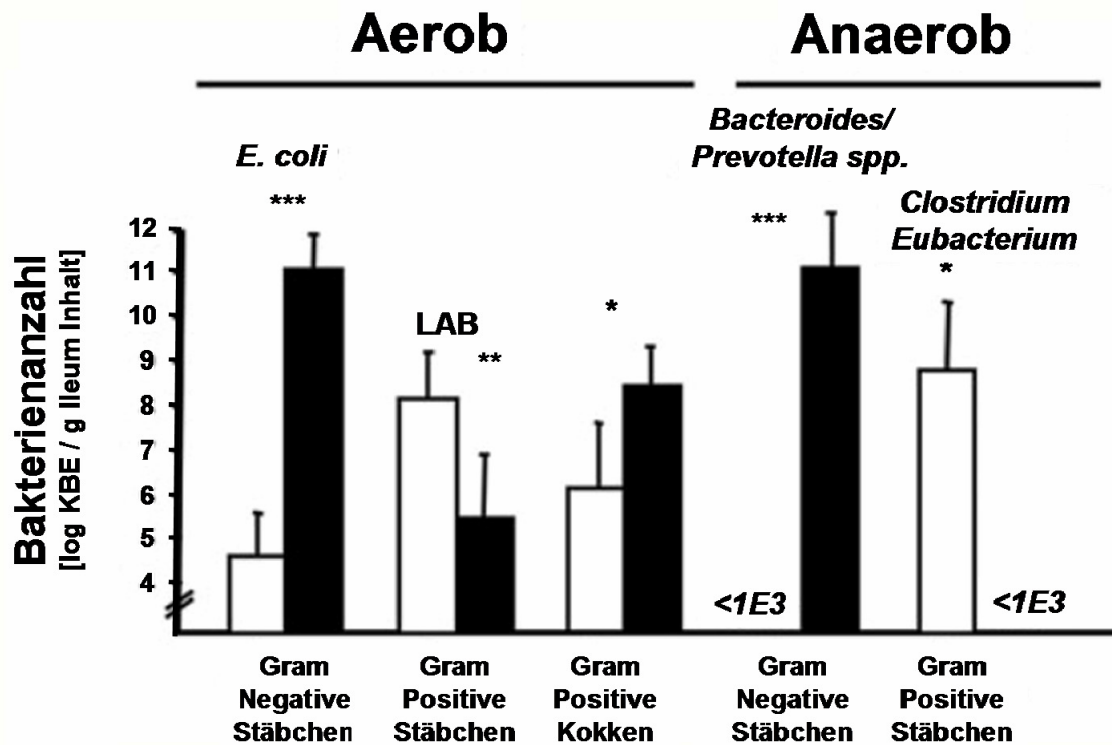


Abb. 7: Quantifizierung kultivierbarer Bakterien im gesunden und entzündeten Ileum. Die Bakterienanzahlen (log KBE/g Ileuminhalt) von gesunden (weisse Balken) und von Tieren mit Ileitis am Tag acht nach *T. gondii*-Infektion (schwarze Balken) wurden durch Kultivierung ermittelt. *E. coli*, Milchsäurebakterien (LAB, hauptsächlich Lactobacilli), *Bacteroides/Prevotella* spp. und *Eubacterium/Clostridium* spp. wurden mit biochemischer Leistungsprüfung identifiziert. Mittelwerte und Standardabweichung aus drei unabhängigen Experimenten (*p<0,05 im Vergleich zu Bakterien in gesunden Mäusen).

Die Ergebnisse der detaillierten Bakterienanalyse zeigten, dass die Bakterienflora im Ileum am Tag acht nach *T. gondii*-Infektion durch aerobe und anaerobe Gram-negative Stäbchen Bakterien, *E. coli* und *Bacteroides/Prevotella* spp. dominiert wurde.

3.1.2 Histopathologie und Populationsdynamik der Ileitis

Es sollte untersucht werden, ob und wie sich die Darmflora im Verlauf der Dünndarmentzündung veränderte, und ob Zusammenhänge zwischen dem Entzündungsgrad und Veränderungen der Darmflora erkennbar waren. Dazu wurden Gewebeproben histopathologisch an den Tagen drei, fünf, sechs, sieben und acht nach *T. gondii*-Infektion untersucht. Zusätzlich wurde die Zusammensetzung der Population der Darmbakterien im Ileum an denselben Zeitpunkten durch PCR-DGGE analysiert. In

Abb.9B ist die Kinetik der Histopathologie im terminalen Ileum gezeigt, wie sie sich nach oraler Infektion mit 100 Zysten *T. gondii* in suszeptiblen C57BL/6-Mäusen entwickelte. Die Analyse der Histopathologie des terminalen Ileums ergab, dass von Tag drei bis Tag fünf nach der Infektion eine nur geringgradige Entzündungsreaktion mit Punktwerten bis zwei im „Histo-Score“ nachweisbar war (Abb.8). Ab Tag fünf verstärkte sich die Entzündung zunehmend mit Punktwerten um ca. vier am Tag sechs p.i. Am Tag acht waren die Tiere mit einem Maximalwert von sechs im „Histo-Score“ schwer krank und wurden getötet.

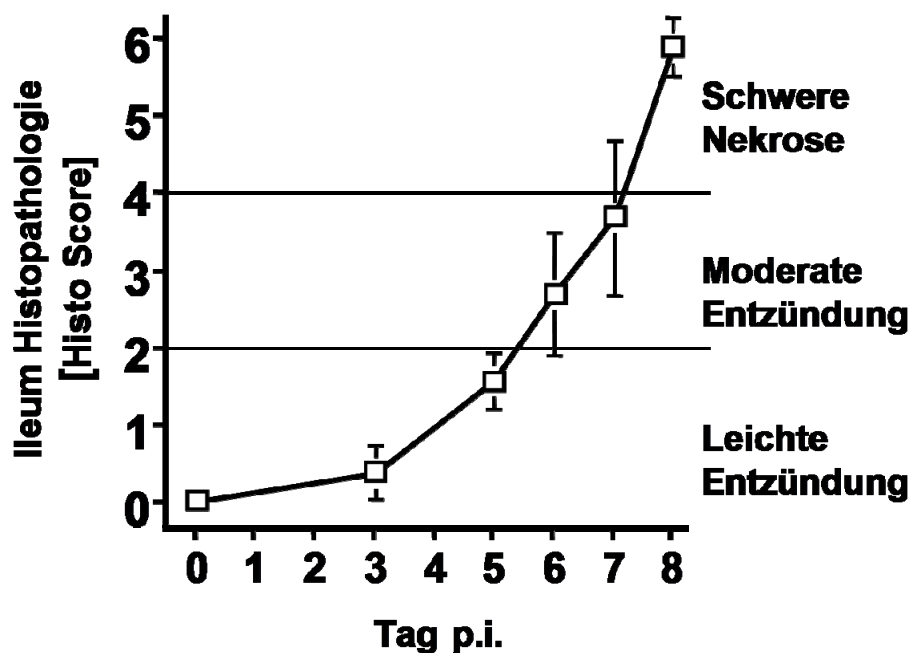


Abb. 8: Kinetik der Histopathologie des terminalen Ileums nach *T. gondii*-Infektion. Das Ileum (n=4) wurde an den Tagen null, drei, fünf, sechs, sieben und acht nach Infektion mit 100 Zysten des *T. gondii*-Stamms ME49 analysiert

Die akute Phase des Entzündungsprozesses zwischen Tag sechs bis acht war von zellulärer Abschlüpfung, massiver Gewebeerstörung und Epithelnekrose begleitet (Zustand am Tag acht p.i, siehe Abb.9A). Die Darstellung der Darmflora mittels PCR-DGGE ergab, dass diese akute Phase der Ileitis mit grundlegenden Änderungen der Darmflora einherging (Abb.9B). Die Analyse der Anzahl der Banden im DGGE-Gel ergab, dass die bakterielle Diversität mit fortschreitender Entzündung und Gewebeerstörung abnahm. Im entzündeten Darm wiesen Veränderungen der Laufgeschwindigkeit der bakteriellen 16S rRNA-Genfragmente darauf hin, dass sich auch die Zusammensetzung der Artengemeinschaft verschoben hatte und nur noch wenige Bakteriengruppen die Darmflora (Tag acht p.i.) dominierten (Abb.9B). Dies unterstützte die Beobachtungen aus der kulturellen Florenanalyse (3.1.1).

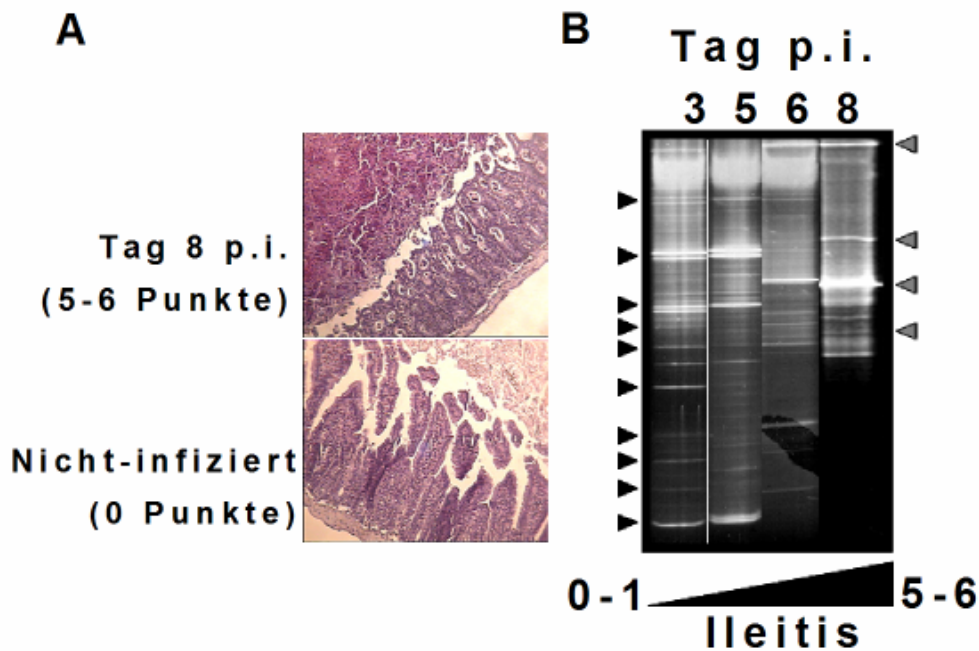


Abb. 9 (A/B): Histopathologie der *T. gondii*-induzierten Ileitis und Populationsdynamik der Darmbakterien im Verlauf der Entzündungsreaktion. Dargestellt sind HE-gefärbte Schnitte von Ilea gesunder und *T. gondii*-infizierter Mäuse mit schweren Nekrose im Ileum am Tag acht p.i. (B) Darstellung des DGGE-basierten „Monitoring“ der Populationsdynamik der Darmflora im terminalen Ileum im Verlauf der Entzündung. Die genetischen Fingerabdrücke aus Gesamt-DNA vom Darminhalt nach Amplifikation von 16S rRNA-Genen ($n=3$) für Tag drei, fünf, sechs und acht nach *T. gondii*-Infektion mit den korrespondierende Histopathologie-Punktwerte (unten angezeigt). Die schwarzen und grauen Pfeile markieren Spezies, die während der Entzündung verschwinden bzw. erscheinen. Die zugrundeliegenden Daten stammen aus mindestens drei Mäusen/Gruppe/Experiment. Die Reproduktion erfolgte in zwei unabhängigen Experimenten.

Die Tatsache, dass drastische Änderungen der Darmflora dann auftraten, wenn ab Tag sechs nach der *T. gondii*-Infektion auch zunehmende Gewebeschäden vorlagen, wies darauf hin, dass die Florenveränderung im Sinne einer reduzierten Diversität mit dem Schweregrad der Entzündungsreaktion assoziiert war.

3.1.3 Molekulargenetische Analyse der Darmflora

Die kulturelle Analyse wurde durch den Einsatz molekulargenetischer Methoden ergänzt. Die PCR-DGGE wurde als kulturunabhängiges Verfahren angewendet, um ein „Monitoring“ der bakteriellen Diversität des Ileuminhalts durchzuführen und um zusätzlich zu den kultivierbaren Spezeis möglicherweise vertretene nicht-kultivierbare Bakteriengruppen zu detektieren.

3.1.3.1 PCR-DGGE

Die PCR-DGGE und anschließende Identifizierung von 16S rRNA aus ausgeschnittenen DGGE-Banden konnte die Ergebnisse aus der kulturellen Analyse bestätigen. Die bakterielle Gemeinschaft des gesunden Ileums bestand aus einer diversen Flora, die vor

allem von *Lactobacillus* sp. dominiert wurde. Die Ergebnisse der 16S Sequenzanalyse aus ausgeschnittenen DGGE-Banden erlaubte keine genauere taxonomische Einordnung der *Lactobacillus* spp. bezogen auf die individuellen Banden, z.B. bei *L. murinus/animalis* oder *L. gasseri/johnsonii*, so dass diese hier jeweils in einer Gruppe dargestellt wurden (Abb.10). Daneben konnten auch 16S Gene für *Eubacterium/Clostridium* spp., *Bifidobacterium* spp. und *Desulfovibrio* sp. im gesunden Ileum nachgewiesen werden. Es fanden sich zudem Vertreter, die taxonomisch den *Bacteroides/Prevotella* spp. (*Porphyromonadaceae*) zugeordnet werden konnten. Im entzündeten Zustand war zunächst eine deutliche Reduktion von Banden im DGGE-Profil zu erkennen. Die Flora wurde darüber hinaus am Tag acht p.i., wenn die Tiere sich in einem präfinalen Zustand befanden, von *Enterobacteriaceae* dominiert (Abb.10). DNA-Banden, die *Eubacterium/Clostridium* spp. und *Bifidobacterium* spp. repräsentierten, verschwanden hingegen, ebenso konnten *Lactobacillus* spp. nicht mehr nachgewiesen werden. *Desulfovibrio* spp. waren sowohl im gesunden wie im entzündeten Darm nachweisbar.

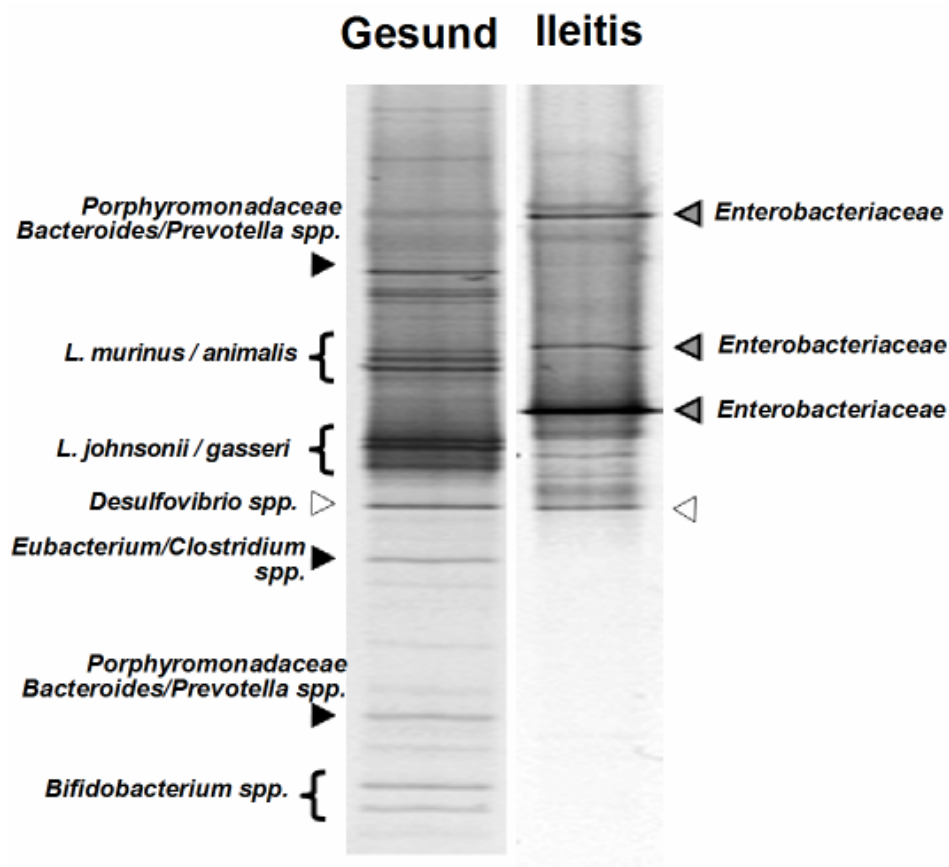


Abb. 10: Identifikation von Darmbakterien im gesunden und entzündeten Ileum nach PCR-DGGE und 16S rRNA Sequenzanalyse ausgeschnittener Banden. Dargestellt sind die genetischen Fingerabdrücke zur Darstellung der ilealen Darmflora bei C57BL/6 Mäusen nach Amplifikation von 16S rRNA Genen. Die aufgetrennten Amplifikate wurden aus dem DGGE-Gel isoliert und sequenziert. Die taxonomische Zuordnung von 16S rRNA-Genen zu bakteriellen Taxa ist angezeigt. Schwarze bzw. graue Pfeile zeigen Spezies an, die während der Ileitis verschwinden bzw. erscheinen. Offene Pfeile markieren Bakteriengruppen, die sich bei Entzündung nicht verändern. Die Daten sind repräsentativ für mindestens drei Mäuse pro Gruppe aus drei unabhängigen Experimenten.

Die Tatsache, dass sich die Ergebnisse aus den DGGE-Profilen mit der detaillierten kulturellen Analyse deckten, wies darauf hin, dass die DGGE als „Monitoring“-Verfahren geeignet war, um Änderungen der bakteriellen Diversität im Maudarm darzustellen, auch wenn eine Quantifizierung aufgrund des PCR-Schrittes nicht möglich war.

3.1.3.2 16S rRNA Klonbibliotheken

Die Beobachtungen aus der Kultivierung und der DGGE-Profile wurden durch die Analyse von 16S rRNA-Klonbibliotheken, hergestellt aus Gesamt-DNA vom Darminhalt gesunder bzw. kranker Tiere (n=3 für jede Gruppe) unterstützt (Abb.11). Insgesamt wurden 156 16S rRNA-Sequenzen analysiert, davon 35 von Tieren mit Ileitis und 121 von gesunden Mäusen. Die Analyse der gesunden Darmflora ergab eine Dominanz von Firmicutes (*Lactobacillus/Clostridium* spp.) und Bacteroidetes (*Bacteroides/Prevotella* spp.) mit einem Anteil von 67% bzw. 28% am 16S rRNA Genpool. *L. johnsonii* war die am häufigsten vertretende *Lactobacillus*-Spezies (36,6% bezogen auf Firmicutes), gefolgt von *L. murinus* (20%), *L. reuteri* (9,9%), *L. intestinalis* (3,3%) und taxonomisch nicht näher identifizierbaren *Lactobacillus* spp. (30,2%). Proteobacteria (Desulfovibrionales, Burkholderiales) und Actinobacteria (Coriobacteriales, Bifidobacteriales) repräsentierten lediglich 5% der 16S rRNA-Klone. Im Gegensatz dazu, fanden sich in Klonbibliotheken aus DNA des entzündeten Ileums am Tag acht p.i. (nicht dargestellt in Abb.11) ausschliesslich 16S rRNA-Gene von *Enterobacteriaceae* (96,6%) und *Bacteroides* spp. (3,4%).

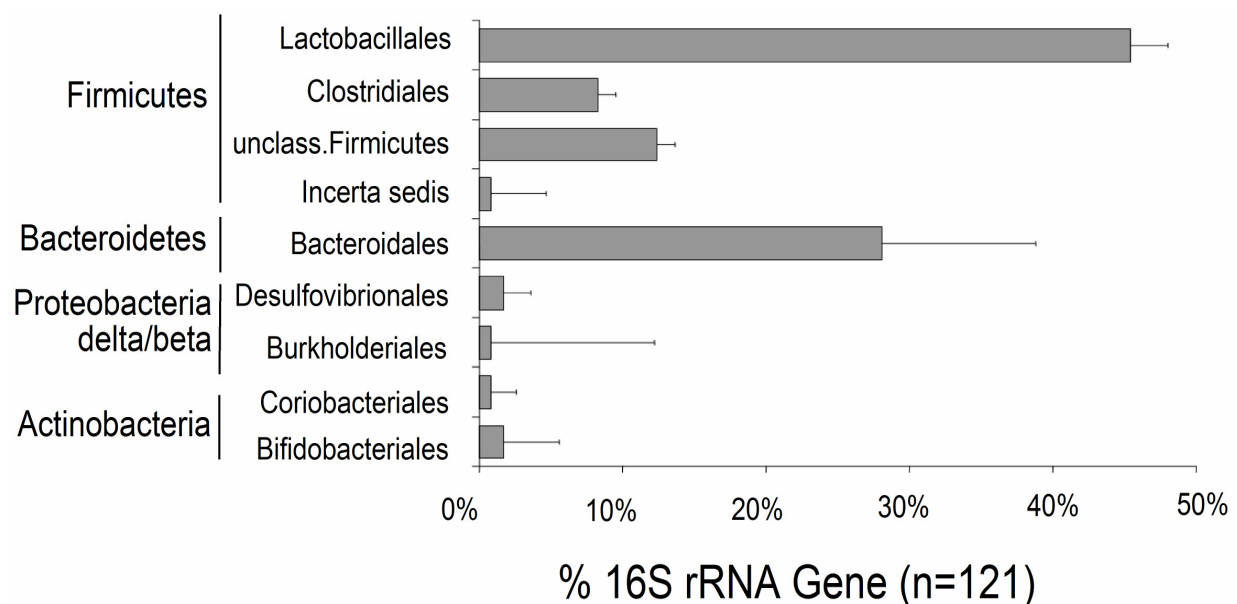


Abb. 11: Analyse der 16S rRNA-Gene in Klonbibliotheken aus bakterieller DNA vom Darminhalt gesunder C57BL/6 Mäuse mit relativer Verteilung am Gesamt-DNA-„Pool“. Die bakteriellen Taxa sind auf der Y-Achse, die korrespondierenden prozentualen Anteile auf der X-Achse dargestellt. Die Analyse wurde für 121 Klonsequenzen aus drei gesunden Tieren (je 30, 46 und 45 Klone/Tier) und für 35 Klonsequenzen aus zwei Ileitis-kranken Tieren (je 20 bzw. 15 Klone/Tier; in Abb. nicht gezeigt) durchgeführt. Für die taxonomische Einordnung wurden die Programme BLASTN (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>) und das „SeqMatch“-Modul des „Ribosomal Database Project II“ (<http://rdp.cme.msu.edu>) verwendet.

Im Zusammenhang mit der umfangreichen Analyse der Darmflora im gesunden und entzündeten Ileum deckten sich die Befunde aus den 16S rRNA-Klonbibliotheken und der DGGE mit den Ergebnissen der kulturellen Analyse. Die Darmflora im Ileum der gesunden Mäuse, bestand aus einer überwiegend Gram-positiven Bakteriengemeinschaft, die im Entzündungszustand durch Gram-negative Bakterienarten verdrängt wurde. Die Daten aus kultureller, molekulargenetischer und histologischer Analyse zeigten, dass das Auftreten der Gram-negativen Flora im entzündeten Ileum mit dem Schweregrad der Immunpathologie assoziiert war.

3.1.3.3 Typisierung von *E. coli*

3.1.3.3.1 RAPD-PCR

Die Ergebnisse, die mittels der o.g. Analysen einen deutlichen Anstieg von *E. coli* im entzündeten Ileum ergaben, warfen die Frage auf, ob die im Entzündungszustand isolierten *E. coli*-Stämme endogener Natur oder exogen erworben waren und möglicherweise pathogene Eigenschaften aufwiesen. Die RAPD-PCR bot die Möglichkeit, mit einer einfachen PCR-basierten Methode zahlreiche Isolate in einem Parallelansatz genotypisch zu untersuchen. Bei dieser Technik zeigen Unterschiede in den zufällig generierten Bandenmustern an, dass Isolate genetisch nicht identisch sind und als separate Subpopulation aufgefasst werden können, die durch klonale Expansion expandiert sind. Um dies zu prüfen, wurden aus den Ilea von C57BL/6 Mäusen (n=5) mit *T. gondii*-induzierter Ileitis und gesunden Tieren (n=3) *E. coli*-Einzelkolonien isoliert. Insgesamt wurde die DNA von 140 *E. coli*-Isolaten aus Ileitis-Darminhalt und 60 *E. coli*-Isolate aus gesundem Ileum mit der RAPD-PCR untersucht. In Abb.12 sind jeweils zwei repräsentative Bandenmuster pro Tier dargestellt. Die Ergebnisse der RAPD-PCR zeigten, dass die Muster von *E.coli*-Isolaten aus dem entzündeten und gesunden Ileum identisch waren.

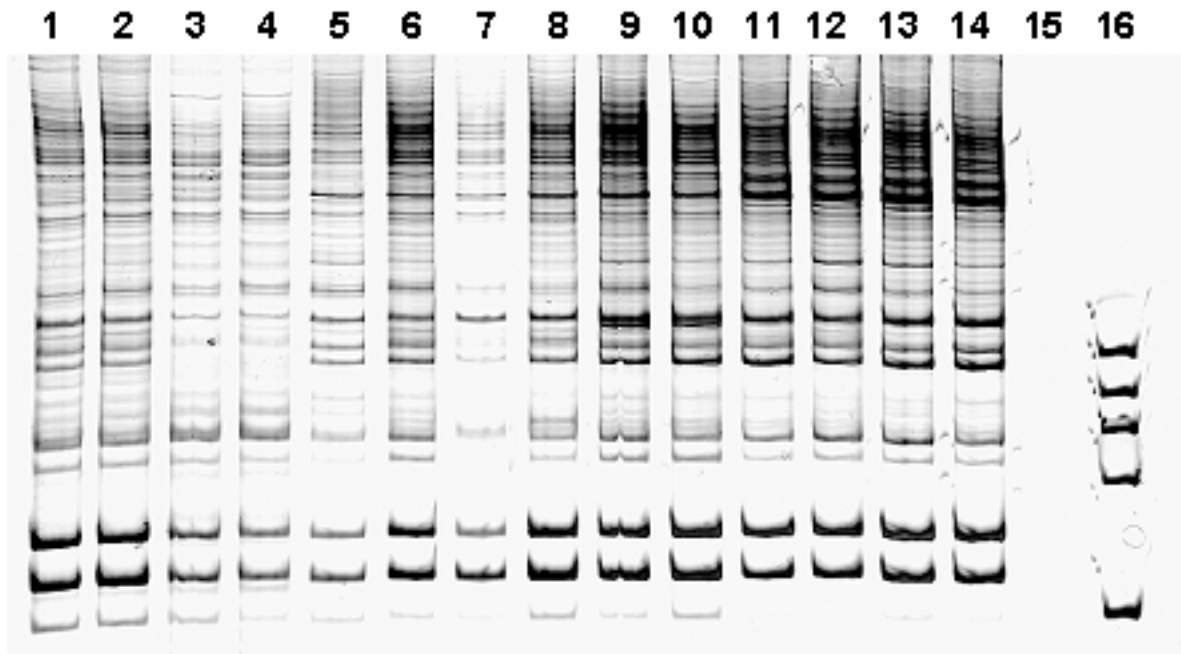


Abb. 12: RAPD-PCR Genotypisierung von DNA aus *E. coli*-Isolaten. Dargestellt sind die RAPD-Bandenmuster von Isolaten aus dem Ileum bei *T. gondii*-induzierter Ileitis (Nummer 1-10) und aus dem Ileum gesunder Tiere (Nummer 11-14). Dargestellt sind je zwei repräsentative Isolate pro Tier. Die Gesamtzahl der Isolate betrug: 140 Isolate aus 5 Tieren mit Ileitis bzw. 60 Isolate aus 3 Tieren, ohne Ileitis. Die Spuren 15 bzw. 16 zeigen die Leerkontrolle ohne DNA in der PCR bzw. einen DNA-Größenmarker.

Nahezu identische genetische Fingerabdrücke (RAPD-PCR) von *E. coli*-Isolaten aus den Ilea von gesunden und kranken Tieren deuteten darauf hin, dass der im Entzündungsfall akkumulierende *E. coli*-Stamm höchstwahrscheinlich aus der normalen Darmflora der gesunden Maus stammte.

3.1.3.3.2 Pathotypisierung

Der Beitrag von *E. coli* zur Histopathologie wäre aufgrund des Anstiegs um mehrere logarithmische Stufen im entzündeten Ileum auch mit dem Vorhandensein von pathogen-assoziierten Genen erklärbar. Einige der bei *E. coli* bekannten pathogen-assoziierten Gene wurden daher in ausgewählten Isolaten aus den gesunden bzw. entzündeten Ilea von C57BL/10 und C57BL/6 Wildtyp-Mäusen und TLR-defizienten Tieren untersucht (siehe auch 3.2). Dabei wurden folgende Gene auf Vorhandensein oder Abwesenheit geprüft: Shiga-Toxin 1/2 (*stx1/2*), Intimin (*eaeA*), alpha-Hämolysin (*hlyA*), Serinprotease (*espA*), Katalase/ Peroxidase (*katP*) und hitze-stabiles Enterotoxin (*astA*). Es erfolgte eine stichprobenartige Auswahl von Isolaten, da die Ergebnisse der RAPD-PCR bereits eine klonale Expansion von *E. coli* nahelegten. Die Isolate 1-3-1, 8-1-1 und 8-2-1 (Abb.13) stammten aus den 60 Isolaten von gesunden Mäusen, die bereits in der RAPD-PCR untersucht worden waren.

	Herkunft	Kultur	<i>stx</i> ₁	<i>stx</i> ₂	<i>eaeA</i>	<i>hlyA</i>	<i>espP</i>	<i>katP</i>	<i>astA</i>	<i>recA</i>	<i>tolC</i>
Isolat 1	wt B10 inf	Lactose +	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅	+	+
Isolat 3	wt B10 naiv	Lactose +	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅	+	+
Isolat 5	TLR2 inf	Lactose -	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅	(+)	(+)
Isolat 12	TLR4 naiv	Lactose -	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅	+	+
Iso 1-3-1	wt BL6 inf	Lactose +	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅	+	+
Iso 8-1-1	wt BL6 naiv	Lactose +	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅	+	+
Iso 8-2-1	wt BL6 naiv	Lactose +	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅	+	+

Abb. 13: Pathotypisierung von *E. coli*-Isolaten. *E. coli*-Isolate aus dem Ileum naiver Wildtyp C57BL/10, BL6 und TLR4-defizienten Tieren und infizierter BL10/BL6 und TLR2-defizienten Mäusen. Die Laktose-Verwertung wird als +/- angezeigt. Nachweis von Shiga-Toxin Genen (*stx*₁/*stx*₂) mittels LightCycler; Gennachweis für *eaeA*, *hlyA*, *espA*, *katP*, *astA*, *recA*, *tolC* mit konventioneller PCR (s. 2.9.2).

Da keine pathogen-assoziierten Gene in den ausgewählten *E. coli*-Isolaten nachweisbar waren und von einer klonalen Expansion kommensaler *E. coli* ausgegangen wurde, waren die immunpathologischen Veränderungen bei der *T. gondii*-Ileitis wahrscheinlich nicht durch Toxine, Hämolysine, Proteasen oder andere Pathogenitätsfaktoren von *E. coli* verursacht worden.

3.1.4 Behandlung der Ileitis mit Antibiotika

3.1.4.1 Prophylaktische Behandlung mit Ciprofloxacin / Metronidazol

Nachdem die Ileitis mit einem massiven Anstieg von *E. coli* und *Bacteroides/Prevotella* spp. im Lumen entzündeter Dünndarmabschnitte verbunden war und die hohe Zahl von Gram-negativen Bakterien an der Mukosa auch den direkten Kontakt von Bakterien mit dem Epithel begünstigte, sollte überprüft werden, ob eine Eradiktion der Gram-negativen Flora eine positive Auswirkung auf die Histopathologie und die Überlebensrate der Tiere hatte. Dazu wurden die Mäuse mit Antibiotika behandelt, welche die entsprechenden Darmbakterien eradizierten. Die Mäuse wurden prophylaktisch, also vor der *T. gondii*-Infektion, bzw. therapeutisch, nach der Infektion mit Antibiotika behandelt (siehe 2.3.8). Während über 90% der Antibiotika-behandelten Tiere die akute Infektion überlebten, waren am Tag acht p.i. alle Placebo-behandelten Kontrolltiere verstorben. Die prophylaktische Behandlung mit Ciprofloxacin (Cf) und Metronidazol (Mtz) fünf Tage vor der *T. gondii*-Infektion resultierte in einer Überlebensrate von 60% am Tag zehn p.i. (Abb.14A). Am Tag 22 p.i. waren noch 25% dieser Tiere am Leben. Ciprofloxacin bzw. Metronidazol-Monobehandlung resultierte in einem Überleben von ca. 40% bzw. 30% am Tag zehn p.i. Von den Metronidazol-behandelten Tieren waren am Tag 22 alle verstorben, wohingegen zumselben Zeitpunkt von den Ciprofloxacin-behandelten Tiere noch 15% am Leben waren. Mäuse mit einer kombinierten Behandlung von Ciprofloxacin/Metronidazol zeigten eine leichtgradig bessere Histopathologie im Vergleich zu den jeweils monobehandelten Tieren, die nur eine milde bis moderate Dünndarmentzündung entwickelten. Alle Antibiotika-behandelten Tiere zeigten eine signifikant verbesserte Histopathologie des Dünndarms im Vergleich zu Placebo-behandelten Kontrolltieren (Abb.14B). Eine Antibiotikaprophylaxe führte zu einer signifikanten Reduzierung der Darmlängenverkürzung, deren Ausmass den Entzündungsgrad widerspiegelte (in Colitismodellen beschrieben). Bei Mäusen mit schwerer Ileitis war die Dünndarmlänge um $19,0 \pm 4,8\%$ verkürzt im Vergleich zu nichtinfizierten Kontrolltieren. Signifikant weniger Dünndarmverkürzung konnte bei Tieren gemessen werden, die mit Ciprofloxacin ($8,6 \pm 6,1\%$, $p < 0,05$), Metronidazol ($9,3 \pm 2,1\%$, $p < 0,01$) oder einer Kombination aus Ciprofloxacin/Metronidazol ($9,5 \pm 3,4\%$, $p < 0,01$) behandelt wurden im Vergleich zu Placebo-behandelten Tieren am Tag acht p.i.

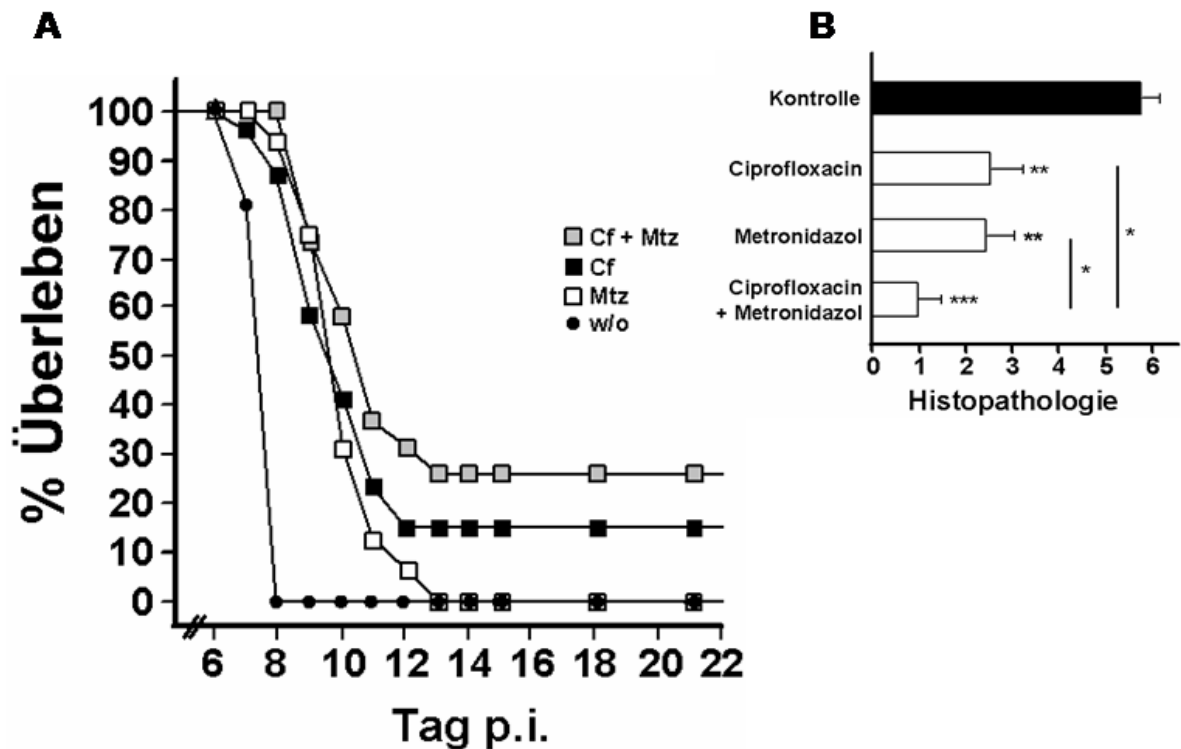


Abb. 14: Überlebensraten und Histopathologie bei Mäusen mit *T. gondii*-induzierter Ileitis und prophylaktischer Antibiotikabehandlung. (A) Dargestellt sind die Überlebensraten bei Behandlung ab Tag fünf vor *T. gondii*-Infektion mit Ciprofloxacin (Cf, schwarze Quadrate, n=19), Metronidazol (Mtz, offene Quadrate, n=16) Ciprofloxacin plus Metronidazol (Cf + Mtz, graue Quadrate, n=19), Kontrolle (w/o, schwarze Kreise, n=10). (B) Dargestellt ist die Histopathologie am Tag acht p.i. bei Ciprofloxacin-, Metronidazol- und Ciprofloxacin/Metronidazol-behandelten Tieren (n=5 pro Gruppe). Angegeben sind Mittelwerte+Standardabweichung (*p<0,05 Cf+Mtz vs Monobehandlung; **p<0,01; ***p<0,001 Antibiotikabehandlungen im Vergleich zur Kontrolle). Daten in Kooperation mit David Fuchs (med.Dissertationsschrift).

Eine parallel durchgeführte kulturelle Analyse der Darmflora bestätigte, dass aerobe und anaerobe Gram-negative Stäbchen durch die Behandlung mit Ciprofloxacin bzw. Ciprofloxacin/Metronidazol auf weniger als 10^3 KBE/g (Nachweisgrenze) Ileuminhalt gesenkt und damit fast vollständig eradiziert worden waren. Die Mengen von aeroben Gram-positiven Bakterien v.a. Enterokokken nahmen bei kombinierter Gabe von Ciprofloxacin/Metronidazol im Vergleich zu nichtbehandelten *T. gondii*-infizierten Kontrollen um vier bis fünf logarithmische Stufen ab, der Unterschied war aber nicht signifikant (Tab.13).

Tab. 13: Bakterienkonzentrationen (log KBE/g Ileuminhalt) nach Antibiotikabehandlung (Daten in Kooperation mit David Fuchs, medizinische Dissertationsschrift)

Behandlungsgruppe (Antibiotika)	Aerob			Anaerob	
	Gram-negative Stb.	Gram-positive Stb.	Gram-positive Kokken	Gram-negative Stb.	Gram-positive Stb.
Ohne Behandlung					
Nicht infiziert	$7,2 \pm 9,0 \times 10^4$	$5,7 \pm 6,6 \times 10^8$	$5,9 \pm 8,8 \times 10^6$	$< 1 \times 10^3$	$1,1 \pm 0,9 \times 10^9$
Infiziert *	$1,2 \pm 0,9 \times 10^{11}$	$5,5 \pm 4,1 \times 10^5$	$6,8 \pm 6,6 \times 10^8$	$1,1 \pm 1,8 \times 10^{11}$	$< 1 \times 10^3$
Prophylaktische Behandlung					
Infiziert (Ciprofloxacin)	$< 1 \times 10^3$	$5,0 \pm 6,9 \times 10^7$	$0,5 \pm 1,1 \times 10^9$	$3,2 \pm 7,1 \times 10^8$	$< 1 \times 10^3$
Infiziert (Metronidazol)	$5,3 \pm 6,8 \times 10^9$	$2,6 \pm 2,7 \times 10^8$	$3,5 \pm 2,9 \times 10^9$	$< 1 \times 10^3$	$< 1 \times 10^3$
Infiziert (Ciprofloxacin + Metronidazol)	$< 1 \times 10^3$	$1,1 \pm 1,3 \times 10^8$	$1,5 \pm 3,1 \times 10^4$	$< 1 \times 10^3$	$< 1 \times 10^3$
Therapeutische Behandlung					
Infiziert (Ciprofloxacin)	$< 1 \times 10^3$	$3,7 \pm 3,6 \times 10^7$	$0,5 \pm 1,1 \times 10^5$	$3,7 \pm 8,3 \times 10^8$	$< 1 \times 10^3$
Infiziert (Metronidazol)	$3,3 \pm 3,9 \times 10^9$	$5,1 \pm 6,1 \times 10^5$	$5,1 \pm 4,7 \times 10^9$	$< 1 \times 10^3$	$< 1 \times 10^3$
Infiziert (Ciprofloxacin + Metronidazol)	$< 1 \times 10^3$	$1,1 \pm 1,3 \times 10^7$	$3,3 \pm 5,1 \times 10^3$	$< 1 \times 10^3$	$< 1 \times 10^3$

*Mäuse mit schwerer Ileitis am Tag acht nach *T. gondii*-Infektion, n=5 pro Gruppe.

3.1.4.2 Behandlung einer bestehenden Ileitis mit Ciprofloxacin/Metronidazol

Um zu zeigen, wie sich eine Antibiotikabehandlung auf eine bereits bestehende Ileitis auswirkte, wurden die Tiere ab dem Tag fünf p.i. täglich mit den o.a. Antibiotika behandelt. Wie bereits erwähnt, waren am Tag fünf p.i. erste histopathologische Veränderungen und parallel dazu ein quantitativer Anstieg der Gesamtbakterienlast, sowie eine qualitative Verschiebung der Dünndarmflorenzusammensetzung erkennbar. Wie bei der prophylaktischen Antibiotikabehandlung wurde auch bei therapeutischen kombinierten Behandlung mit Ciprofloxacin/Metronidazol der Anteil der aeroben Gram-negativen Stäbchen Bakterien auf weniger als 1×10^3 KBE/g, also bis zur Nachweisgrenze, gesenkt (Tab.13). 20% der Tiere, die eine Kombinationsbehandlung aus Ciprofloxacin/Metronidazol erhalten hatten, überlebten die akuten Phase der Ileitis (Abb.15A) von Tag 14 p.i. bis zum Ende der Beobachtung am Tag 22 p.i. Eine Monobehandlung mit Ciprofloxacin bzw. Metronidazol ergab einen Überlebensvorteil von

ca. drei Tagen bis Tag 10/11 p.i. gegenüber den Tieren der Placebo-behandelten Kontrollgruppe, die alle am Tag acht p.i. verstorben waren. Die Histopathologie war bei therapeutischer Antibiotikabehandlung unabhängig vom Antibiotikaregime im Vergleich zu unbehandelten Tieren signifikant verringert (Abb.15B), wobei sich zwischen den Behandlungsgruppen keine histopathologischen Unterschiede ergaben.

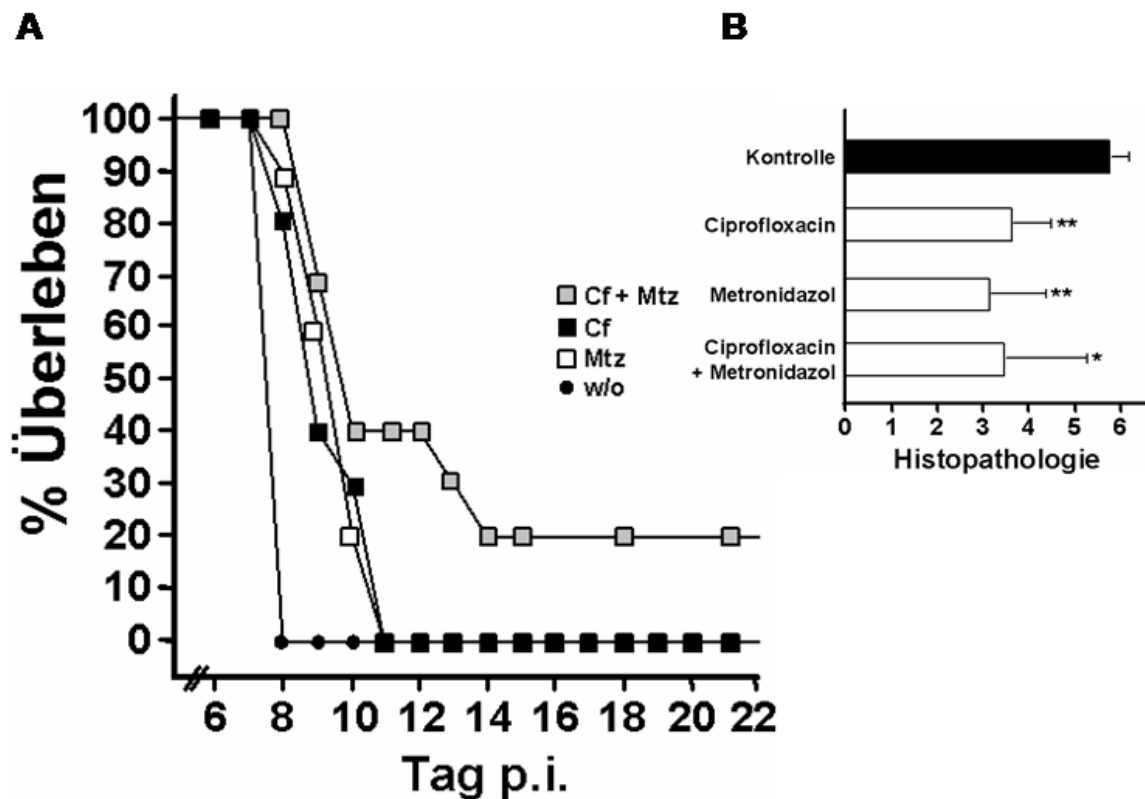


Abb. 15: Überlebensraten und Histopathologie bei Mäusen mit *T. gondii*-induzierter Ileitis und therapeutischer Antibiotikabehandlung. (A) Dargestellt sind die Überlebensraten für Behandlung ab Tag fünf nach *T. gondii*-Infektion mit Ciprofloxacin (Cf, schwarze Quadrate, n=10), Metronidazol (Mtz, offene Quadrate, n=10), Ciprofloxacin plus Metronidazol (Cf + Mtz, graue Quadrate, n=10), Kontrolle (w/o, schwarze Kreise, n=8). (B) Dargestellt ist die Histopathologie bei Ciprofloxacin-, Metronidazol- und Ciprofloxacin/Metronidazol-behandelten Tieren (n=5 pro Gruppe). Angegeben sind Mittelwerte+Standardabweichung (*p<0,05;**p<0,01 im Vergleich zur Kontrolle). Daten in Kooperation mit David Fuchs (med. Dissertationsschrift).

Die prophylaktische Antibiotikabehandlung mit einer Kombination aus Ciprofloxacin und Metronidazol war effektiver als die jeweilige Monobehandlung bzw. der therapeutische Ansatz. Gesteigerte Überlebensraten und geringere Gewebeschäden waren in beiden Behandlungsschenkeln von einer reduzierten Immunantwort im Ileum begleitet. Dies wurde durch niedrigere in Ileum-Organulturen gemessenen NO- und IFN-gamma Werte von behandelten Tieren im Vergleich zur Kontrolle deutlich (Abb.16), die den bei gesunden Tieren gemessenen Werten entsprachen.

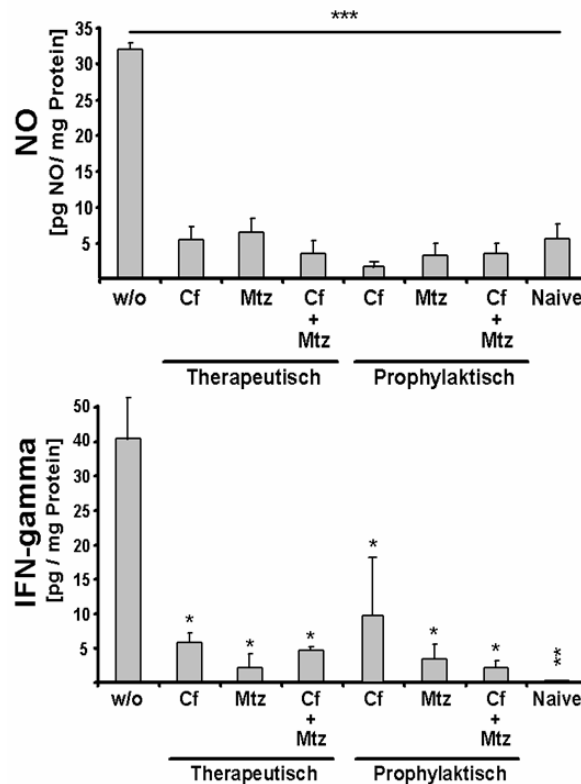


Abb. 16: Messung von Immunmediatoren in Ileum-Organkulturüberständen nach prophylaktischer Gabe bzw. therapeutischer Antibiotikabehandlung einer bestehenden *T. gondii*-induzierten Ileitis. Dargestellt sind die NO- bzw. IFN-gamma Werte (pg/mg Protein) für die prophylaktische/ therapeutische Behandlung (Tag fünf vor bzw. nach *T. gondii*-Infektion). Cf = Ciprofloxacin, Mtz= Metronidazol, w/o=keine Antibiotika, Naive= keine Toxo-Infektion. (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$).

Da IFN-gamma und NO als Marker für eine Th1-vermittelte Immunantwort gelten und an der Ausprägung des entzündlichen Gewebeschadens ursächlich mitbeteiligt sind, lässt sich aus den Ergebnissen schliessen, dass die erniedrigten Werte für IFN-gamma und NO in antibiotikabehandelten Tieren und die damit assoziierte bessere Histopathologie, sowie der Überlebensvorteil als Folge der Eradikation der Gram-negativen Flora zu werten sein könnte (siehe dazu 4.1.2).

3.1.5 Gnotobiotische C57BL/6-Tiere und definierte Rekolonisierung

Der spezifische Beitrag einzelner Bakteriengruppen zur *T. gondii*-induzierten Ileitis wurde bei sogenannten gnotobiotischen (griech.: gnōtós = definiertes; bios = Leben) C57BL/6-Wildtyptieren, bei denen keine kultivierbare Darmflora mehr nachweisbar war, analysiert. Zur Generierung gnotobiotischer Mäuse wurde die Darmflora mit einer fünffachen Antibiotikabehandlung über sechs Wochen eradiziert (siehe 2.3.9). Da sämtliche Tiere dieselbe Antibiotikabehandlung erhielten und sich lediglich durch ihren Kolonisierungsstatus unterschieden, sollte der Beitrag einzelner Bakterien zur Ausprägung der Dünndarmentzündung untersucht werden. Von den gnotobiotischen

Tieren ohne Rekolonisierung mit Bakterien überlebten 80% die akute Phase der Infektion am Tag neun p.i. und 75% dieser Tiere überlebten bis zu Tag 28 nach *T. gondii*-Infektion. Im Gegensatz dazu verstarben alle Tiere, die mit Darminhalt von Ileitis-kranken Tieren oder SPF-Flora rekonstituiert waren, an Tag acht p.i. (Abb.17A). Die Überlebensraten korrelierten mit den im Ileum beobachteten entzündlichen Veränderungen. Während im Ileum gnotobiotischer Tiere keinerlei Entzündungszeichen am Tag acht p.i. nachweisbar waren, entwickelten SPF-Tiere und mit Darminhalt kranker Tiere rekonstituierte gnotobiotische Mäuse zum selben Zeitpunkt schwerwiegende histopathologische Schäden (Abb.17B). Wenn gnotobiotische Tiere mit einzelnen Bakterienarten rekolonisiert wurden, dann unterschied sich das inflammatorische Potenzial der einzelnen Bakterienarten deutlich voneinander. Mäuse, die mit *E. coli* monoassoziiert wurden, zeigten eine moderate Histopathologie mit drei Punktwerten im „Histo-Score“ des Ileums am Tag acht p.i., überlebten aber nicht nach Tag 13 p.i. (Abb.17A und B). Mit *Bacteroides/Prevotella* spp. kolonisierte Tiere unterschieden sich histopathologisch nicht signifikant von der *E. coli* Gruppe, es überlebten aber bis zu 22% der Tiere bis Tag 28 nach *T. gondii*-Infektion. Gnotobiotische Mäuse mit einer *L. johnsonii*-Monoassoziation entwickelten dagegen keine Ileitis. Mehr als 80% dieser Tiere überlebten bis Tag neun p.i. und 37.5% bis zum Ende des Beobachtungszeitraums (Abb.17A und B). Eine Rekolonisierung mit *L. johnsonii*, *Bacteroides* sp. oder *Bacteroides/Prevotella* spp. resultierte in einer leichten Erhöhung der NO-Werte gegenüber den gnotobiotischen Tieren. Nach Kolonisierung mit *E. coli*, SPF-Flora oder Darminhalt kranker Tiere stiegen die gemessenen NO-Werte in Ileum-Organokulturen nochmals deutlich an (Abb.17C). Gnotobiotische Mäuse und solche, die mit *L. johnsonii*, *Bacteroides* sp., *Bacteroides/Prevotella* spp. oder *E. coli* rekolonisiert waren, zeigten keine signifikanten Unterschiede der IFN-gamma-Werte untereinander. Eine Kolonisierung mit Darminhalt kranker Tiere oder SPF-Flora resultierte jedoch in einem signifikanten Anstieg gegenüber den anderen Gruppen (Abb.17D).

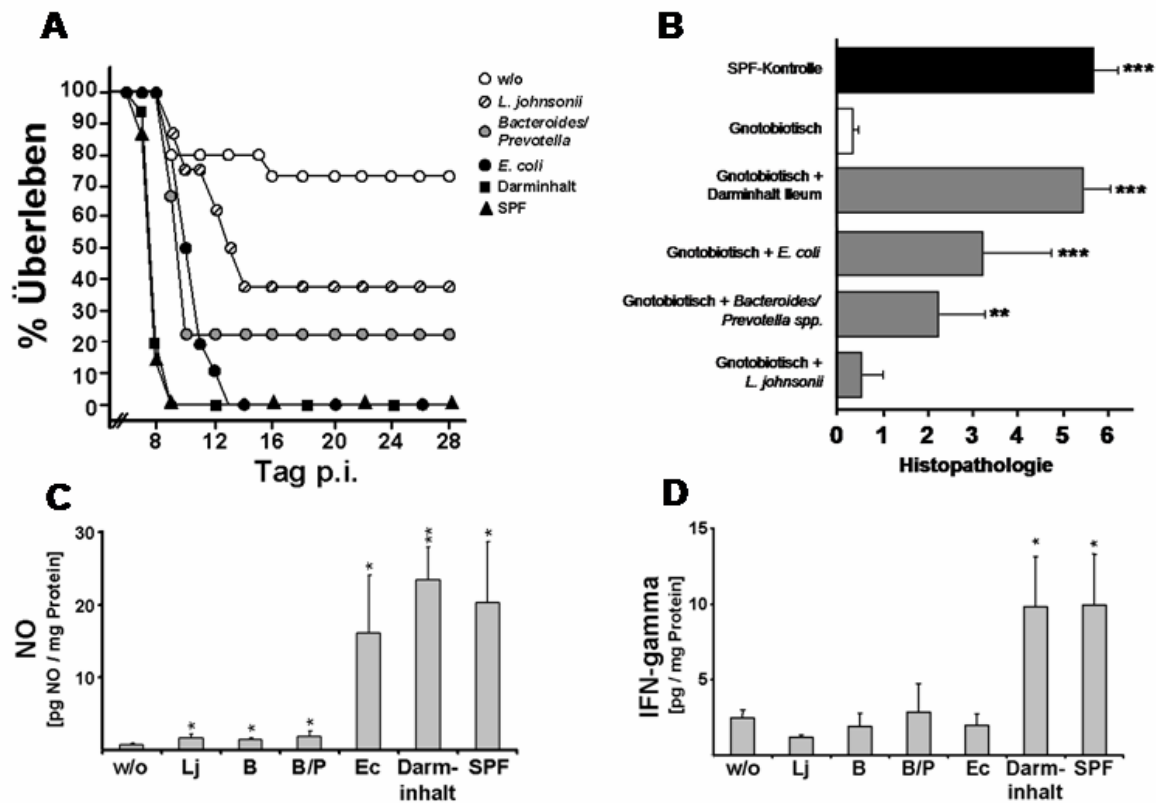


Abb. 17: Darstellung der Überlebensraten und Histopathologie bei rekolonisierten gnotobiotischen Tieren mit *T. gondii*-Ileitis. (A) Darstellung der Überlebensraten gnotobiotischer Tiere (n=15, offene Kreise, w/o), gnotobiotischer Tiere besiedelt mit: Ileitis-Darminhalt kranker Tiere (n=7, schwarze Quadrate), *E. coli* (n=10, schwarze Kreise), *Bacteroides/Prevotella* spp. (n=9, graue Kreise) oder *L. johnsonii* (n=10, gestrichelte Kreise). Tiere mit konventioneller SPF-Flora (schwarze Dreiecke) dienten als Kontrolle. (B) Darstellung entzündungsbedingter Gewebeschäden in gnotobiotischen bzw. rekolonisierten Tieren. Analyse der Histopathologie am Tag acht p.i. bei gnotobiotischen Tieren besiedelt mit: Ileitis-Flora, *E. coli*, *Bacteroides/Prevotella* spp. oder *L. johnsonii* oder ohne Besiedelung. Die *T. gondii*-infizierten SPF-Tiere dienten als Kontrolle (je n=5). Angegeben sind Mittelwerte+Standardabweichung (**p<0,01;***p<0,001 im Vergleich zu nichtkolonisierten gnotobiotischen Tieren). (C/D) Darstellung der NO- und IFN-gamma-Werte im Überstand von Ileum-Organokulturen von gnotobiotischen Tieren ohne Kolonisierung (w/o), nach Kolonisierung mit: *L. johnsonii* (Lj), *Bacteroides* spp. (B), *Bacteroides/Prevotella* spp. (B/P), *E. coli* (Ec) oder Darminhalt von Tieren mit Ileitis. SPF-Tiere als Kontrolle. Angegeben sind Mittelwerte+Standardabweichung (n=5/Gruppe; *p<0,05; **p<0,01 im Vergleich zu nichtkolonisierten gnotobiotischen Tieren). Daten in Kooperation mit David Fuchs (med. Dissertationsschrift).

Eine Assoziation von *E. coli* und *Bacteroides/Prevotella* spp. verstärkte additiv die Ausprägung der *T. gondii*-Ileitis, so dass klar gezeigt werden konnte, dass diese beiden Gram-negativen Bakteriengruppen an der Induktion der Immunpathologie ursächlich beteiligt waren.

3.2 Einfluss von TLR-Defizienz auf die Darmflora bei *T. gondii*-induzierter Ileitis

Im *T. gondii*-Ileitis Modell mit C57BL/6 Mäusen konnte bereits gezeigt werden, dass ein massiver intraluminaler Konzentrationsanstieg von *E. coli* und *Bacteroides/Prevotella* spp. die Entzündungsreaktion verstärkte. Um zu untersuchen, ob das Vorliegen einer TLR-Defizienz einen Einfluss auf die Zusammensetzung der Darmflora und die Entzündungsreaktion haben könnten, wurde die Darmflora bei C57BL/10-Wildtyp Mäusen und TLR-defizienten Tieren mit *T. gondii*-Ileitis analysiert. Das *T. gondii*-Ileitis Modell war ursprünglich für C57BL/6 Mäuse etabliert worden. Da die TLR-defizienten Tiere aber einen C57BL/10 genetischen Hintergrund aufwiesen, wurde in Vorversuchen getestet, wie sich eine *T. gondii*-Infektion auf die C57BL/10-Tiere in diesem Modell auswirkte. Die Florenvergleiche und die klinischen Daten zeigten, dass sich die beiden Mausstämme bezüglich der Florenzusammensetzung und Entwicklung der *T. gondii*-induzierten Ileitis nahezu gleich verhielten (Daten hier nicht gezeigt). Die C57BL/10-Tiere entwickelten den präfinalen Zustand bzw. eine den C57BL/6-Tieren vergleichbare schwere Histopathologie nach *T. gondii*-Infektion mit einem Tag Verzögerung, so dass die Probennahme am Tag neun p.i. erfolgte. Die TLR-defizienten Tiere waren entweder homozygot defizient für TLR2, einem Rezeptor zur Erkennung von Zellwandbestandteilen aus Gram-positiven Bakterien, oder für TLR4, einem spezifischen Rezeptor für LPS aus der Zellwand Gram-negativer Bakterien oder für beide.

3.2.1 Analyse der kultivierbaren Darmflora TLR-defizienter Tiere

Eine detaillierte Analyse der kultivierbaren luminalen Darmflora im Ileum zeigte, dass die Konzentrationen der identifizierten Bakteriengruppen, sowohl im gesunden wie auch im Zustand der *T. gondii*-Ileitis TLR-unabhängig waren. Bei Wildtypen sowie TLR-defizienten Mäusen war der Grad der Ileitis (Tag neun p.i.) von einer Veränderung der Darmflora begleitet. Während der Ileitis stieg sowohl im Wildtyp, als auch bei den TLR-defizienten Tieren die Menge von *E. coli* signifikant an. Der Anstieg betrug bei den Wildtypen und den TLR2+4^{-/-} Tieren fünf bis sechs logarithmische Stufen, bei den TLR2^{-/-} und TLR4^{-/-} drei bis vier Stufen (Abb.18A). Während der Ileitis (Tag neun p.i.) war eine nicht signifikanter Anstieg der strikt anaeroben Gram-negativen Stäbchen (*Bacteroides/Prevotella* spp.) um 2-3 logarithmische Größenordnungen im Vergleich zum gesunden Zustand zu beobachten (Abb.18B). Die *Bacteroides*-Population setzte sich aus *B. ovatus*, *B. merdae*, *B. uniformis*, *B. vulgatus* und *B. thetaiotaomicron*, die *Prevotella*-Population aus *P. oralis* und *P. buccae* zusammen. Die Anzahl der Gram-positiven Stäbchen im luminalen Ileuminhalt war bei Wildtyp-Mäusen im Vergleich zu TLR-defizienten Tieren allenfalls leicht reduziert. Die Zahl der Enterokokken (*Enterococcus faecalis*, *E. faecium*, *E. gallinarum*) zeigte einen im Vergleich zum gesunden Zustand nicht signifikanten Anstieg (Abb.18A).

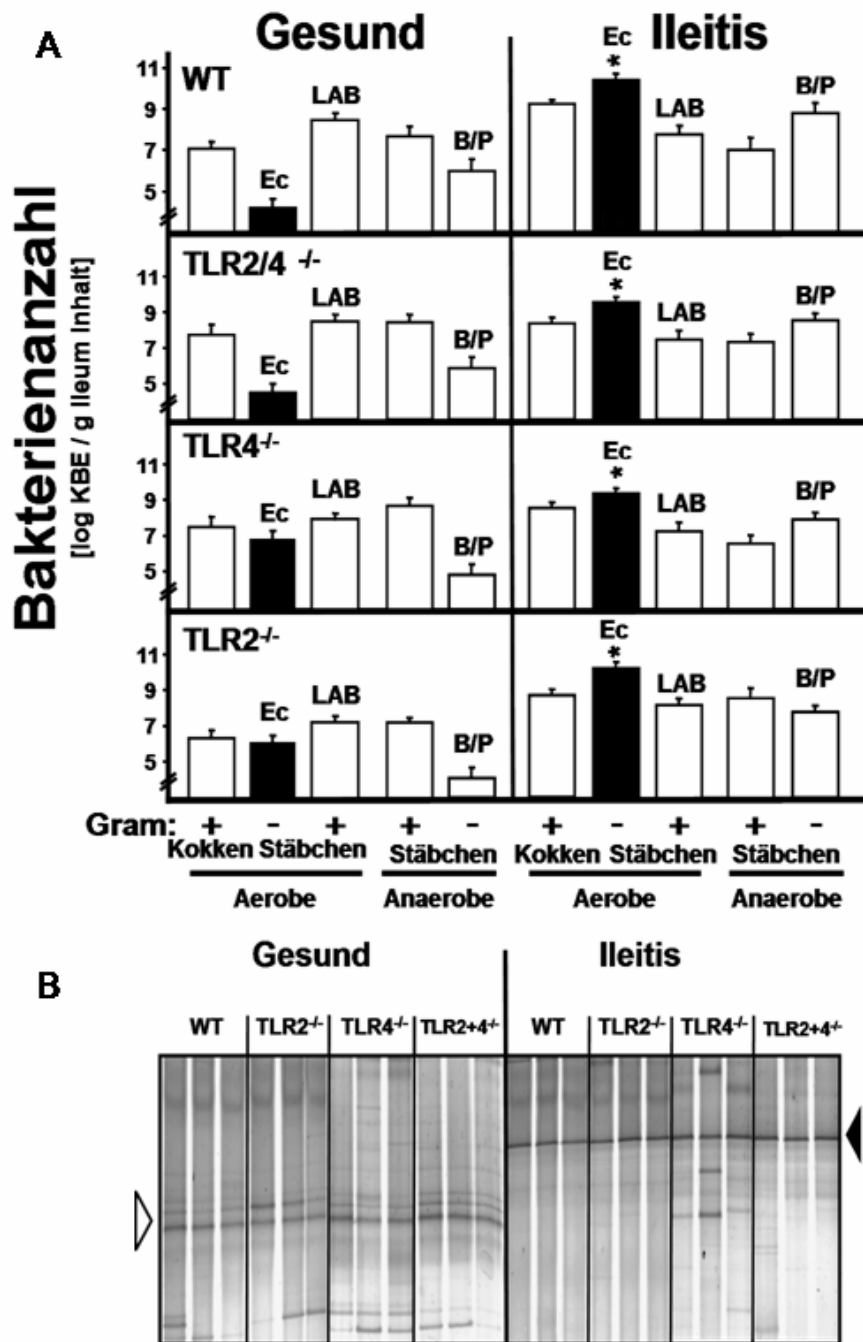


Abb. 18: Analyse der kultivierbaren Darmflora in TLR-defizienten Tieren mit und ohne *T. gondii*-Ileitis. (A) Dargestellt sind die Bakterienkonzentrationen im Ileum von gesunden (n=6) und Tieren mit ausgeprägter Ileitis am Tag neun p.i. (n=9). *E. coli* (Ec), Milchsäurebakterien (LAB, hauptsächlich *Lactobacillus* spp.), *Bacteroides* / *Prevotella* spp. (B/P). Die Identifikation einzelner Isolate wurde durch 16S rRNA-Sequenzierung bestätigt. Angegeben sind Mittelwerte+Standardabweichung (*p<0,05). Die Daten wurden in Kooperation mit Julia Niebergall (med. Dissertationsschrift) erhoben. (B) PCR-DGGE Analyse (16S rRNA variable Regionen V6-V8) der Darmflora bei TLR-defizienten Mäusen mit *T. gondii*-induzierter Ileitis. Der Darminhalt von gesunden Mäusen (n=3) und an Ileitis erkrankten Tieren (je n=5) wurde am Tag neun p.i analysiert. Dargestellt sind die Ergebnisse für Wildtyp BL10 (WT, n=3), TLR2^{-/-}, TLR4^{-/-} und TLR2+4^{-/-} (je n=3). Im Rahmen des Entzündungsprozess verschwindende *Lactobacillus* spp. (offener Pfeil) bzw. erscheinende *Enterobacteriaceae* (schwarzer Pfeil) DNA-Banden wurden mittels 16S Sequenzanalyse identifiziert.

3.2.2 PCR-DGGE der Darmflora TLR-defizienter Tiere

Die Ergebnisse der kultivierbaren Flora konnten durch genetische Fingerabdrücke mittels PCR-DGGE bestätigt werden (Abb.18B). Die Sequenzierung von 16S rRNA-Genen aus den korrespondierenden DNA-Banden der DGGE-Profile bestätigte, dass Laktobazillen, die im gesunden Ileum dominant waren (weisser Pfeil, Abb.18B), im entzündeten Ileum durch *Enterobacteriaceae* verdrängt wurden. Diese akkumulierten im Ileum bei Tieren mit schwerer Entzündung (schwarzer Pfeil, Abb.18B). Es war weder im gesunden noch im entzündeten Ileum ein signifikanter Einfluß einer TLR-Defizienz auf die Zusammensetzung der Darmflora erkennbar.

3.2.3 Überleben, Histopathologie und Immunantwort bei TLR-defizienten Tieren

Da sich in den kulturellen und molekularen Analysen der Florenzusammensetzungen von bzw. bei Wildtyp und TLR-defizienten Tieren nur minimale Unterschiede gezeigt hatten, sollte anschliessend die Frage beantwortet werden, ob ähnlich zusammengesetzte Bakteriengemeinschaften bei TLR-defizienten Tieren auch ähnliche Auswirkungen auf die Entzündungsausprägung nach *T. gondii*-Infektion hatten. Dazu wurden die Überlebensraten der Tiere, die Histopathologie des Ileums und die Konzentrationen von IFN-gamma und NO in Überständen von Ileum-Organkulturen analysiert. Die klinischen Parameter der Darmentzündung unterschieden sich signifikant zwischen dem Wildtyp und den TLR4-defizienten Tieren. Verglichen zum Wildtyp und den TLR2^{-/-} Tieren wiesen die TLR4^{-/-} und TLR2+4^{-/-} Tiere eine verringerte Mortalität und Histopathologie auf, erkennbar an höheren Überlebensraten (Abb.19A) und verringerten Punktwerten in der Histopathologie (Abb.19B). Die Analyse zeigte, dass es zwischen Wildtyp und TLR2^{-/-} ($p < 0,88$) und zwischen TLR4^{-/-} und TLR2+4^{-/-} ($p < 0,73$) keine signifikanten Unterschiede im kumulativen Überleben gab. Die Überlebensraten (Abb.19A) zeigten, dass die TLR2+4^{-/-} Tiere zu 80% am Tag zehn p.i. überlebten und zu 60% bis Tag 22 p.i. Die TLR4^{-/-} Tiere überlebten zu ca. 65% am Tag zehn p.i. und zu 55% bis Tag 22 p.i. Deutlich davon abgesetzt waren die TLR2^{-/-} Mäuse, die am Tag zehn p.i. nur 20% Überleben zeigten, welches sich vom Tag 14 p.i. bis zum Ende des Beobachtungszeitraumes auf 10% absenkte (Log Rank Test $p < 0,0012$ TLR2^{-/-} versus TLR4^{-/-}). Die C57BL/10-Wildtypen waren nach Tag 10 p.i. alle verstorben und zeigten damit ein signifikant schlechteres Überleben als TLR4-defiziente Tiere (Log Rank Test $p < 0,0004$ WT versus TLR2+4^{-/-}) (Abb. 19A).

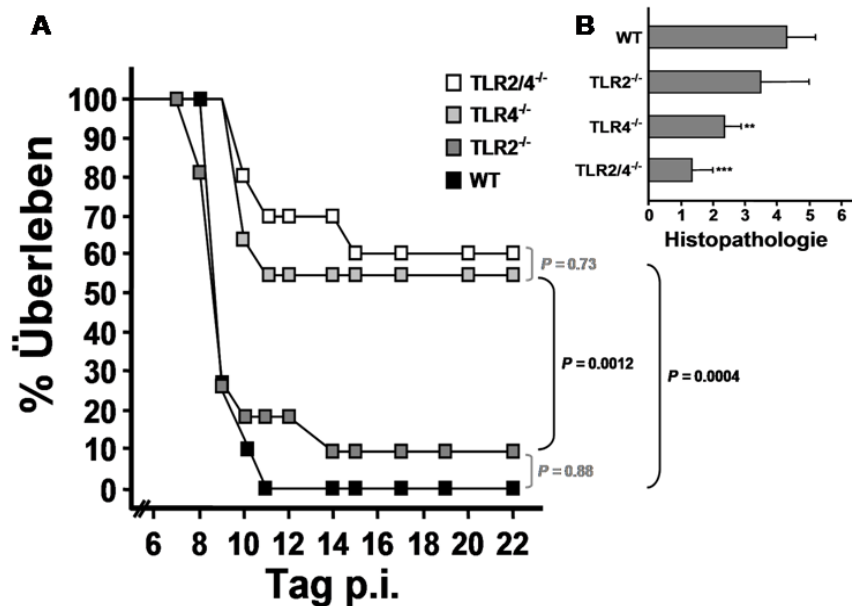


Abb. 19: Überlebensraten bei TLR2^{-/-}, TLR4^{-/-} oder TLR2+4^{-/-} Mäusen mit *T. gondii*-induzierter Ileitis. (A) Dargestellt ist das Überleben von C57BL/10-Wildtyp (WT, schwarz, n=10), TLR2^{-/-} (dunkelgrau, n=11), TLR4^{-/-} (hellgrau, n=11) und TLR2+4^{-/-} (n=8). Die Ergebnisse stammen aus zwei unabhängigen Experimenten. Das Überleben wurde bis Tag 22 p.i. beobachtet. Die Überlebensraten wurde mit dem Kaplan-Meier-Test analysiert. Die Signifikanzen wurden mit dem „Log Rank“ Test berechnet und sind in schwarz bzw. hellgrau dargestellt. (B) Dargestellt ist Histopathologie des terminalen Ileums bei C57BL/10-Wildtyp (WT, n=5), TLR2^{-/-} (n=5), TLR4^{-/-} (n=5) oder TLR2+4^{-/-} (n=5) am Tag neun p.i. (**p<0,01; ****p<0,001 im Vergleich zum Wildtyp). Daten aus Abb.19A/B in Kooperation mit Julia Niebergall (med.Dissertationsschrift).

Die Histopathologie des Dünndarms war zwischen TLR2^{-/-} Mäusen und Wildtypen nicht unterschiedlich, jedoch zeigten die TLR4^{-/-} und TLR2+4^{-/-} Tiere mit Punktwerten zwischen eins bis zwei eine signifikant verminderte Histopathologie im Vergleich zum Wildtyp (Abb.19B).

Eine verminderte Immunpathologie bei TLR4-defizienten Mäusen war assoziiert mit signifikant niedrigeren Werten für IFN-gamma und NO aus Organkulturüberständen entzündeter Ilea (Abb.20). Die IFN-gamma Werte waren beim Wildtyp und allen TLR-defizienten Tieren im entzündeten Ileum immer signifikant erhöht im Vergleich zum gesunden Ileum. IFN-gamma war jedoch im Ileum der TLR4-defizienten Tiere signifikant gegenüber dem Wildtyp und den TLR2^{-/-} Mäusen erniedrigt (Abb.20A). Die für NO gemessenen Werte zeigten, dass es nur bei Wildtyp und TLR2^{-/-} zwischen gesundem und entzündeten Ileum einen signifikanten Anstieg des NO im entzündeten Dünndarm gab. Die NO-Werte aus Ileum-Organkulturüberständen der TLR4^{-/-} und TLR2+4^{-/-} Mäuse waren im entzündeten Ileum dagegen signifikant gegenüber Wildtyp und TLR2^{-/-} erniedrigt, und erreichten damit das niedrige Niveau der gesunden TLR4^{-/-} bzw. TLR2+4^{-/-} Kontrollgruppen (Abb.20B). Als Ergänzung zu diesen Daten war die *T. gondii*-Infektion und die Dissemination der Parasiten im Dünndarm nicht TLR2- oder TLR4-abhängig. Die Anzahl der Tachyzoiten war in Schnitten vom terminalen Ileum bei Wildtyp und TLR-defizienten Tieren vergleichbar (Daten hier nicht gezeigt; Heimesaat, Fischer *et al.* 2007).

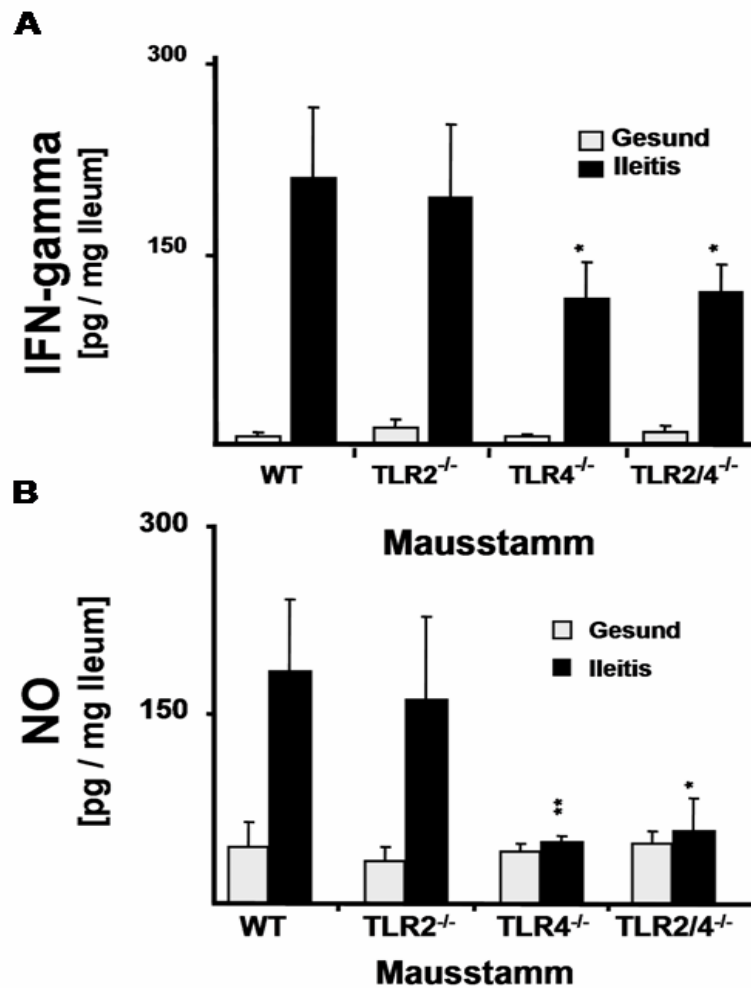


Abb. 20: Proinflammatorische Mediatoren im Ileum von BL10-WT, TLR2^{-/-}, TLR4^{-/-} und TLR2/4^{-/-} Mäusen. Dargestellt sind IFN-gamma- (A) und NO-Konzentrationen (B) in Überständen aus Ileum-Organokulturen (pg/mg Ileum) von C57BL/10-Wildtyp (WT n=5), TLR2^{-/-} (n=5), TLR4^{-/-} (n=5) oder TLR2/4^{-/-} (n=3). Die Analyse erfolgte von Mäusen mit Ileitis am Tag neun p.i. im gesunden Zustand. Angegeben sind Mittelwerte und Standardabweichungen (*p<0,05; **p<0,01).

Die Immunpathologie im terminalen Ileum bei einer *T. gondii*-induzierten Ileitis wurde damit eindeutig durch das Vorhandensein von TLR4 verstärkt.

3.2.4 Einfluss von definierter Rekolonisierung und TLR-Liganden bei gnotobiotischen TLR4-defizienten Mäusen mit *T. gondii*-induzierter Ileitis

Die Ergebnisse aus den o.a. Versuchen zeigten, dass die bei der *T. gondii*-induzierten Ileitis beobachtete Immunpathologie durch eine im Entzündungsverlauf akkumulierende Gram-negative Bakterienflora, massgeblich durch *E. coli* und *Bacteroides/Prevotella* spp. bedingt war. Zum anderen verstärkte das Vorhandensein von TLR4 die Dünndarmentzündung. Dies liess darauf schliessen, dass Komponenten Gram-negativer Bakterien ursächlich an der Immunpathologie beteiligt waren.

3.2.4.1 *E. coli* Monokolonisierung von TLR-defizienten gnotobiotischen Tieren mit *T. gondii*-Ileitis

Gnotobiotische C57BL/10 Wildtyp- und TLR2-, TLR4- und TLR2+4-defiziente Tiere wurden sechs Tage vor der *T. gondii*-Infektion mit einem *E. coli*-Isolat aus einer Ileitis-kranken Maus monokolonisiert (siehe 2.3.9). Die Herstellung gnotobiotischer Tiere erfolgte durch Behandlung mit fünf verschiedenen Antibiotika über sechs Wochen, wonach keine kultivierbare Darmflora mehr nachgewiesen werden konnte (siehe 2.3.9; 3.1.5). Am Tag neun p.i. erreichten die *E. coli*-Konzentrationen bei allen Gruppen eine Höhe von 10^9 - 10^{10} KBE/g Ileuminhalt wie auch in konventionellen (nicht gnotobiotischen) Tieren beobachtet. Gnotobiotische TLR-defiziente Tiere erreichten nach Monokolonisierung damit also die gleiche *E. coli*-Last wie der Wildtyp (Abb.21A). Eine *E. coli*-Monokolonisierung verstärkte die Ileitis bei gnotobiotischen Wildtyp- und TLR2-defizienten Tieren. Dagegen zeigten TLR4- und TLR2+4-defiziente Tiere nur geringgradige Entzündungsreaktionen, erkennbar an Punktwerten von eins, und wiesen damit eine signifikant geringere Histopathologie im Vergleich zum Wildtyp bzw. TLR2^{-/-} Tieren auf (Abb.21B).

3.2.4.2 Gabe von *E. coli* Lipid A bei TLR4-defizienten Tieren mit *T. gondii*-Ileitis

Da die konservierte Lipid A-Komponente des bakteriellen LPS hochspezifisch an TLR4 bindet, wurden gnotobiotische Wildtyp- und TLR4-defiziente Tiere sechs Tage vor der *T. gondii*-Infektion bis Tag neun p.i. mit gereinigtem *E. coli* Lipid A im Trinkwasser behandelt (2.3.9). Es sollte analysiert werden, ob eine Gabe von Lipid A ursächlich für die Auslösung einer immunpathologischen Reaktion bei *T. gondii*-Ileitis sein kann. Die Histopathologie dieser Tiere wurde mit der von *E. coli* monokolonisierten und konventionellen SPF-Mäusen verglichen (Abb.21C). Die Histopathologie der *E. coli* Lipid A-behandelten und der *E. coli*-monokolonisierten Wildtyp-Tiere war am Tag neun p.i. mit Punktwerten von vier im „Histo-Score“ nahezu identisch und damit signifikant erhöht im Vergleich zu den gleich behandelten TLR4^{-/-} Mäusen. Die TLR4-defizienten Tieren

entwickelten dagegen keine Ileitis, denn es war keine Histopathologie, sowohl nach Gabe von *E. coli* Lipid A als auch nach *E. coli*-Monokolonisierung erkennbar. Wildtyp-Mäuse mit SPF-Flora zeigten mit Punktwerten von fünf eine ausgeprägte Histopathologie signifikant erhöht im Vergleich zu den TLR4-defizienten Tieren mit SPF-Flora (Abb.21C).

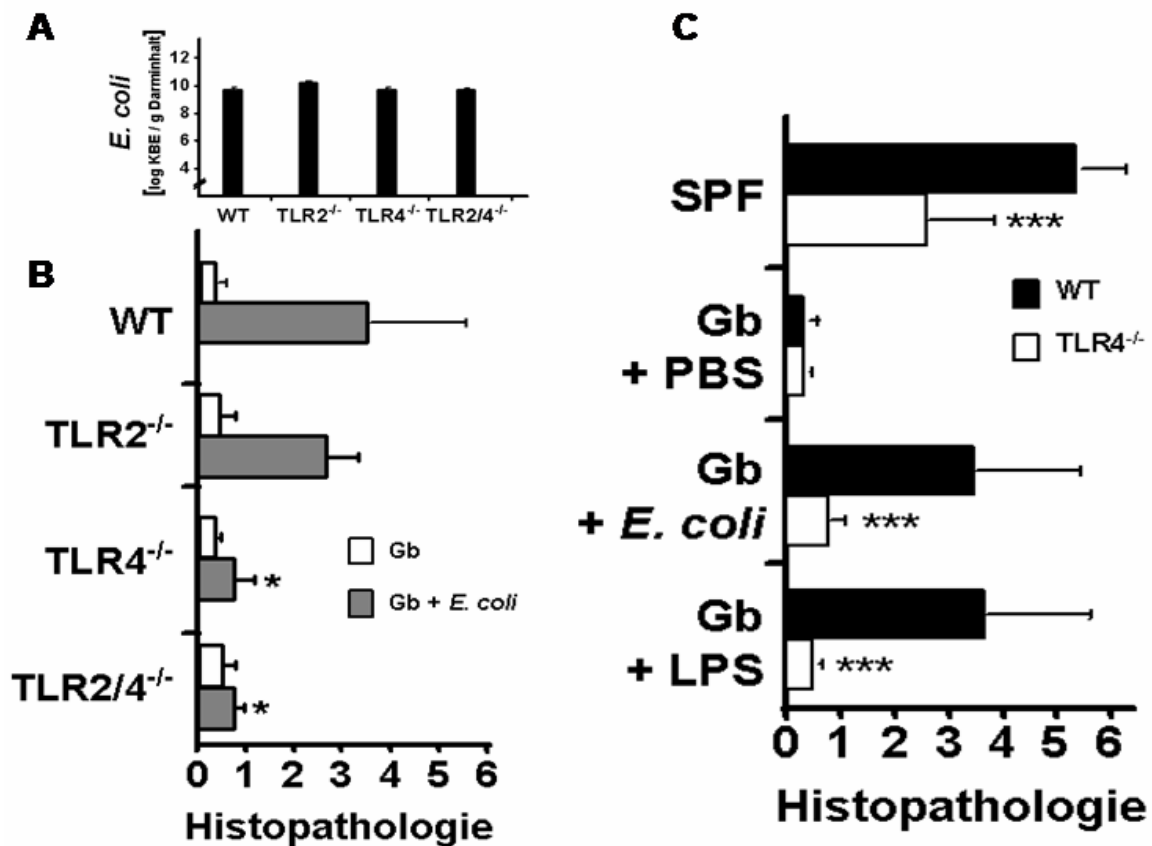


Abb. 21: Abhängigkeit von TLR4 für die Induktion einer *T. gondii*-Ileitis in *E. coli*-monokolonisierten oder mit LPS (Lipid A) behandelten gnotobiotischen Mäusen. (A) *E. coli*-Konzentrationen im terminalen Ileum bei WT (n=3), TLR2^{-/-} (n=3), TLR4^{-/-} (n=3) und TLR2/4^{-/-} (n=3). Mittelwerte+Standardabweichung (nicht signifikant für alle Gruppen). (B) Dargestellt ist der Schweregrad der Ileitis in gnotobiotischen Mäusen (Gb) ohne Besiedelung (weisse Balken) oder mit *E. coli*-Monokolonisierung (graue Balken) am Tag neun p.i. bei Wildtyp-Mäusen (WT, n=3) und TLR2^{-/-} (n=3), TLR4^{-/-} (n=3) und TLR2/4^{-/-} (n=3) Tieren. Angegeben sind Mittelwerte+Standardabweichung (*p<0,05 im Vergleich zum Wildtyp und TLR2^{-/-}). (C) Dargestellt ist der Einfluss oraler Gabe von Lipid A (LPS) auf den Schweregrad der Ileitis bei gnotobiotischen (Gb) Wildtyp- (schwarze Balken, n=4) und TLR4^{-/-}-Tieren (weisse Balken, n=4) am Tag neun p.i. Im Vergleich dazu PBS-behandelte (WT n=22; TLR4^{-/-} n=7), *E. coli*-monokolonisierte (WT n=16; TLR4^{-/-} n=7) und SPF-Tiere (WT n=22; TLR4^{-/-} n=9). Angegeben sind Mittelwerte+Standardabweichung (***p<0,001 Wt versus TLR4^{-/-}). Daten in Kooperation mit Julia Niebergall (med. Dissertationsschrift).

Die Gabe von *E. coli* Lipid A konnte in Wildtyp-Tieren im Rahmen der *T. gondii*-Ileitis eine Immunpathologie auslösen, die der von *E. coli*-monokolonisierten Tieren entsprach (Abb.21C). Die Beobachtung, dass TLR4^{-/-}-Mäuse vor schwerer Entzündung geschützt waren, bestätigte, dass sehr wahrscheinlich Komponenten Gram-negativer Bakterien, im besonderen die Lipid A-Komponente des bakteriellen LPS die Ileitis über den Mechanismus einer LPS/TLR4-vermittelten Signaltransduktion verstärkte.

3.2.5 Behandlung von *T. gondii*-infizierten C57BL/6 Tieren mit Polymyxin B

Um zu untersuchen, ob die oben beschriebene LPS/TLR4-Interaktion als therapeutischer Ansatzpunkt für die Behandlung einer *T. gondii*-induzierte Ileitis dienen könnte, wurden C57BL/6-Wildtyp Mäuse mit dem nicht resorbierbaren LPS-Antagonisten Polymyxin B behandelt. Die Tiere erhielten dazu, wie oben bereits erwähnt, eine prophylaktische oder therapeutische Gabe von Polymyxin B (siehe 2.3.8). Beide Behandlungsregime mit Polymyxin B konnten die Ileitis abmildern. Das war erkennbar an signifikant höheren Überlebensraten an Tag acht p.i. von 63% bei prophylaktischer bzw. 48% bei therapeutischer Behandlung im Vergleich zu Placebo-behandelten Kontrolltieren, die alle an Tag acht p.i. verstorben waren. In der prophylaktischen Behandlungsgruppe überlebten 5% und in der therapeutischen Gruppe 4% der Tiere bis Tag 22 p.i. Die Histopathologie war signifikant geringer bei prophylaktisch (Punktwerte von drei bis vier) bzw. therapeutisch (Punktwerte vier bis fünf) behandelten Tieren im Vergleich zu Placebo-behandelten Kontrolltieren mit Werten von fünf bis sechs (Abb.22A). Da der Schweregrad der Ileitis mit einer signifikanten Verkürzung des kleinen Intestins korreliert (Heimesaat *et al.* 2006), wurde die Dünndarmlänge der behandelten Tiere hier gemessen. Bei Placebo-behandelten Tieren mit schwerer Ileitis (Tag acht p.i.) war das Intestinum signifikant um $19,0 \pm 4,8\%$ verkürzt im Vergleich zu gesunden Kontrollen, wohingegen prophylaktisch mit Polymyxin B behandelte Tiere eine geringere Verkürzung von weniger als 10% aufwiesen (Abb.22B). Eine Abmilderung der Entzündungsreaktion im Dünndarm durch die prophylaktische Gabe von Polymyxin B spiegelte sich auch in den erniedrigten NO-Konzentrationen in Ileum-Organkulturüberständen wider. Prophylaktisch behandelte Tiere wiesen vergleichbar niedrige NO-Werte auf wie gesunde Kontrolltiere (Abb.22C). Eine mikrobiologische Analyse der Darmflora von Polymyxin B behandelten Tieren am Tag acht p.i. zeigte, dass der Anteil von *E. coli* durch Polymyxin B von $1,2 \pm 10^{11}$ KBE/g Ileuminhalt auf weniger als 10^3 KBE/g gesenkt und damit selektiv eradiziert wurden. Bei den anderen Bakteriengruppen, den aeroben Gram-positiven Stäbchen bzw. Kokken und den anaeroben Gram-negativen bzw. Gram-positiven Stäbchen konnte kein signifikantes Absenken der Bakterienmengen durch die Behandlung mit Polymyxin B nachgewiesen werden (Heimesaat, Fischer *et al.* 2007).

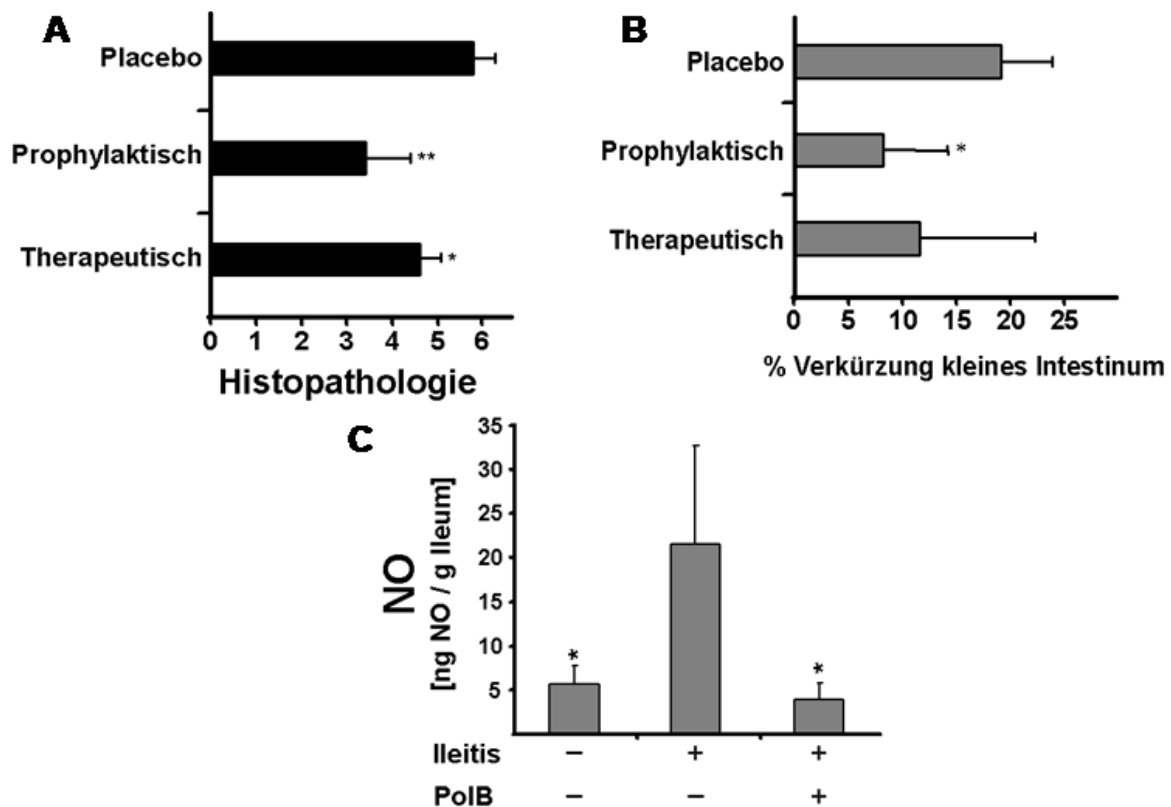


Abb. 22: Histopathologie, Dünndarmverkürzung und NO-Konzentrationen bei C57BL/6-Mäusen mit *T. gondii*-induzierter Ileitis nach Behandlung mit Polymyxin B. (A) Dargestellt sind die Histopathologie-Punktwerte nach prophylaktischer bzw. therapeutischer Polymyxin B Behandlung (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$). (B) Dargestellt ist die prozentuale Dünndarmverkürzung nach prophylaktischer bzw. therapeutischer Polymyxin B Behandlung ($n=5$ /Gruppe) im Vergleich zu Placebo-behandelten Tieren. Angegeben sind Mittelwerte und Standardabweichungen (* $p < 0,05$ im Vergleich zur Placebogruppe). (C) Dargestellt sind die NO-Konzentrationen in Ileum-Organkulturüberständen nach prophylaktischer Polymyxin B Behandlung ($n=4$) und bei Placebo-behandelten Tieren ($n=5$). Angegeben sind Mittelwerte+Standardabweichung (* $p < 0,05$ im Vergleich zur Placebogruppe). Daten in Kooperation mit Julia Niebergall (med. Dissertationsschrift). Die orale Gabe von Polymyxin B führte zu einer Abmilderung einer *T. gondii*-induzierten Ileitis. Das Polymyxin B hatte dabei vermutlich zwei Effekte, zum einen die nachgewiesene selektive Eradizierung von *E. coli* und möglicherweise auch die Abschwächung des TLR4/LPS-vermittelten Signalweges durch Bindung des bakteriellen LPS. Damit konnte in Ergänzung zu den o.a. Ergebnissen bestätigt werden, dass die *T. gondii*-induzierte Dünndarmentzündung durch diesen Signalweg verstärkt wurde. TLR4-Antagonisten könnten demnach einen therapeutischen Ansatzpunkt für die Behandlung der Ileitis bieten (s. Diskussion).

3.2.6 RNA-Expressionsanalyse bei TLR-defizienten Tieren mit *T. gondii*-Ileitis

Um nachzuweisen, ob die Ileitis auch mit der verstärkten Expression entzündungsspezifischer Gene assoziiert war, wurden mRNA-Arrayanalysen von Gesamt-RNA-Extrakten aus dem Ileum jeweils eines C57BL/10-Wildtyp Tieres, eines TLR2- bzw. TLR4-defizienten Tieres im gesunden Zustand und bei *T. gondii*-induzierter Ileitis (Tag acht p.i.) durchgeführt. Zunächst wurden die Expressionsdaten von Wildtyp-Tieren im gesunden im Vergleich zum entzündeten Ileum analysiert. Desweiteren wurden die Expressionsdaten insbesondere auf eine TLR4-abhängige Regulierung hin untersucht. Dies bedeutet, dass nur die TLR4-defizienten Tiere eine Expressionsregulation aufwiesen, während im Wildtyp bzw. TLR2-/- keine Änderung erfolgte („No Change“, siehe 2.10). Da aus Kostengründen zunächst nur jeweils ein gesundes bzw. *T. gondii*-infiziertes Tier (Wildtyp BL10, TLR2^{-/-} und TLR4^{-/-}) untersucht wurde, war keine statistische Analyse möglich. Im Ileum von Wildtyp-Tieren mit schwerer Ileitis war die Expression von Genen für proinflammatorische, z.B. Lipocalin, Chitinase-3-like 3-Protein, CXCL9 oder Calgranulin, als auch antiinflammatorische Faktoren, z.B. Gp49, Timp1 und Suppressoren des Zytokin-Signalweges hochreguliert (Tab.14/15). Die erhöhte bzw. erniedrigte RNA-Expression ausgewählter Transkripte im Wildtyp (Tab.14/15) deckte sich mit den Beobachtungen zur Immunpathologie der Ileitis aus den vorangegangenen Experimenten (3.1.1 bis 3.1.5). Einige regulierte Transkripte werden imfolgenden exemplarisch aufgeführt (Gesamttabellen siehe Anhang Tab.A-C). Das Lipocalin 2 (Lcn2) hindert Bakterien dadurch am Wachstum, dass es die Eisenbindung durch Bakterien über Siderophore verhindert. Die Bildung von Lipocalin 2 (Lcn2) in Immunzellen wird durch TLR4 nach Stimulation mit Bakterien induziert (Flo *et al.* 2004; Fischbach *et al.* 2006). Lcn2 war im Wildtyp deutlich stärker erhöht, als in den TLR-defizienten Tieren. Das Signal log Verhältnis betrug beim Wildtyp 8,25, bei TLR4-defizienten Tieren nur 2,21 (Tab.14). Proteine der Chitinase-Familie sind mit Entzündung assoziiert (Chang *et al.* 2001; Nio *et al.* 2004). Das Makrophagenprotein (Lectin) Ym1 hat eine 30%ige Homologie zur bakteriellen Chitinase und wird bei Entzündungen gebildet (Chang *et al.* 2001). Das in diese Familie gehörende „Chitinase-3-like-3“-Protein, war im Wildtyp mit einem Signal log Verhältnis von 7,25 stärker hochreguliert als bei den TLR2^{-/-} (5,06) bzw. TLR4^{-/-} (5,08). Die heterodimeren S100-Calcium-Bindeproteine A8 und A9 (Calgranulin A/B) sind in Entzündungsherden und im Cytoplasma von neutrophilen Granulozyten zu finden. Nach Stimulation mit LPS kommt es zur Sekretion von Calgranulin A/B aus neutrophilen Granulozyten und Makrophagen und in Folge zur weiteren Migration von neutrophilen Granulozyten (Ryckman *et al.* 2003; Vandal *et al.* 2003; Sunahori *et al.* 2006; Anceriz *et al.* 2007). Da dieser Prozess über LPS stimuliert werden kann, ist er hochwahrscheinlich TLR4-abhängig. Dies konnte z.B. in der Expressionsstärke von S100 A8 (Calgranulin A)

im Wildtyp nachvollzogen werden, die gegenüber TLR4^{-/-}-Tieren deutlich erhöht war (Tab.14). Der Chemokin-Ligand 9 (CXCL9) war in Wildtyp-Tieren ebenfalls sehr deutlich (6,26) im Vergleich zu TLR2^{-/-} (2,37) und TLR4^{-/-} (2,75) hochreguliert. In einem Colitismodell mit adoptiven Transfer von CD4⁺CD25⁻ T-Zellen in SCID-Mäuse konnte z.B. gezeigt werden, dass in Tieren, die durch den Erhalt von CD4⁺CD25⁺ (Treg)-Zellen vor Colitis geschützt waren, die mRNA-Werte für den entzündungsassoziierten Chemokinrezeptor CXCR3 und dessen Ligand CXCL9 deutlich vermindert waren (Kristensen *et al.* 2006). Die RNA-Expression von Gp49A(B), Timp1, Serpina3n und dem Protein Nummer 9 der C-Typ Lectin-Superfamilie wurden z.B. als anti-inflammatorisch kategorisiert. Das auf der Oberfläche von neutrophilen Granulozyten konstitutiv exprimierte Protein Gp49B1 verhindert neutrophil-abhängige Gefäßschäden, die als Antwort auf LPS-Stimulation folgen (Zhou *et al.* 2003). Timp1 (engl.: tissue inhibitor of metalloproteinase 1) ist einer der intrinsischen Inhibitoren von Matrix-Metallo-Proteinasen, die als Haupteffektoren des T-Zell vermittelten Gewebeschadens gelten. In einer cDNA-Makroarray Studie bei Patienten mit ulzerativer Colitis wurde Timp1 als eines der hochregulierten Gene in entzündeten Gewebeabschnitten identifiziert (Okahara *et al.* 2005). In den hier vorliegenden Daten war klar erkennbar, dass im Wildtyp eine verstärkte Aktivierung von Timp1 im entzündeten Ileum vorlag, während die TLR-defizienten Tiere eine Herunterregulation zeigten. Serinprotease-Inhibitoren, z.B. Serpina3 (Antichymotrypsin) nehmen Einfluss auf die Regulation von Proteasen in Leukozyten im Verlauf von Entzündungsvorgängen. Sie gelten als Plasma-Proteinase-Inhibitoren der akuten Phase und kontrollieren überschüssende entzündlich bedingte Gewebeschäden (Dickson & Alper 1974). Proteine der C-Typ Lectin Superfamilie sind an verschiedenen anti-inflammatorischen Antworten beteiligt, beispielsweise an der verstärkten Aggregation von Bakterien (Iovanna & Dagorn 2005). Die Expression von Serpina3 und C-Typ Lectin Nr.9 war im Wildtyp gegenüber TLR4^{-/-} erhöht (Tab.14). Weiterhin waren Transkripte der Gene für Proteine der Zell-Zell-Interaktionen von Lymphozyten wie Selectin, Protocadherin und Phosphoprotein 1 bei *T. gondii*-Ileitis im Wildtyp ebenso hochreguliert, wie das der Komplement-Komponente 1. Die Hochregulierung von Interleukin 1-beta und die Gegenregulation durch einen Suppressor des Zytokin-Signalweges entsprach dem erwarteten Entzündungsprozeß vom Th1-Typ nach *T. gondii*-Infektion ebenso wie die Hochregulierung eines Rezeptors für einen koloniestimulierenden Faktor („CSF-Receptor 2“), der die Migration neutrophiler Granulozyten an den Entzündungsherd steuert (Tab.14).

Tab. 14: **Expression bei Ileitis (Tag acht p.i.) versus Tag null bei Wildtyp BL10, TLR2^{-/-} und TLR4^{-/-}.** Hochregulierte RNA-Expression (Signal log-Verhältnis >3) und funktionelle Zuordnung (Auswahl; Gesamttabelle A, siehe Anhang).

Bezeichnung	Signal log Verhältnis / Genotyp			Molekulare Funktion Biologischer Prozeß (MGI Database)
	WT BL10	TLR2 ^{-/-}	TLR4 ^{-/-}	
Lipocalin 2	8,25	4,14	2,21	Binding, transporter activity
Chitinase3-like3	7,25	5,06	5,08	Inflammatory response
S100 calcium binding protein / A8 (Calgranulin A)	6,07	3,13	1,49	Chemotaxis, calcium ion binding
S100 / A9 (Calgranulin B)	7,08	5,3	4,84	Leukocyte chemotaxis, Calcium ion binding
CXCL9 Chemokine (C-X-C motif) ligand 9	6,26	2,37	2,75	Inflammatory response, Chemokine/cytokine activity
Glycoprotein gp49A	6,69	3,5	1,73	Leukocyte immunoglobulin-like receptor, subfamily B
Serin peptidase inhibitor Serpina3n	6,07	4,32	1,55	Acute phase response, Serine-type endopeptidase inhibitor
C-type lectin superfamily, Nr. 9	6,6	4,06	3,6	Immune response, Heterophilic cell adhesion
Tissue inhibitor of metalloproteinase Timp1	6,16	-0,18	-0,15	Metalloendopeptidase inhibitor activity
Selectin lymphocyte	5,42	0,13	1,32	Cell adhesion of lymphocytes
Protocadherin alpha family	4,2	0,39	-3,78	Calcium dependent cell-cell adhesion
Platelet derived growth factor receptor, alpha polypeptide	5,49	-0,9	0,19	Protein-tyrosine kinase activity, Receptor activity
Complement component 1, subcomponent	4,1	-0,41	0,95	Innate immune response, Proteolysis, Complement
Secreted phosphoprotein 1	5,39	-0,73	2,94	T-helper 1 type immune response, Integrin binding, Cytokine activity
Colony stimulating factor 2 receptor, beta 2, low-affinity (granulocyte-macrophage)	5,49	2,33	0,25	Interleukin receptor activity, Cytokine and chemokine mediated signaling pathway
Interleukin 1 beta	4,66	-1,5	-0,56	Interleukin-1 receptor binding, Inflammatory response, Leukocyte migration, Neutrophil
Suppressor of cytokine signaling 1	5,4	2,48	2,76	Negative regulation of JAK-STAT cascade, Cytokine and chemokine mediated signaling pathway

Während der *T. gondii*-induzierten Ileitis waren beim Wildtyp Gene herunterreguliert, die Kinaseaktivität aufweisen, z.B. die LPS-induzierbare Thymidinkinase, „met proto-oncogene“ und „V-erb-b2“ (Tab.15). „Bcl2-like1“ und das Insulin-ähnliche Wachstumsfaktor-Protein 4 sind mit Anti-Apoptose-Aktivität assoziiert (MGI Database) und führten durch die Herunterregulierung im Wildtyp wahrscheinlich zu einer verstärkten Apoptose-Aktivität. Resistin steht in Verbindung zur angeborenen Immunantwort und Homeostaseaktivität. Hogan *et al.* (2006) konnten in einem DSS-Colitis Modell zeigen, dass ein Resistin-ähnliches Molekül (RELM-beta) wesentlich an der Aufrechterhaltung der Barrierefunktion des Colonepithels beteiligt war. Im Wildtyp und TLR2^{-/-} war die Expression von Resistin deutlich vermindert, nicht aber bei TLR4^{-/-}.

Tab. 15: **Expression bei Ileitis (Tag acht p.i.) versus Tag null bei Wildtyp BL10, TLR2^{-/-} und TLR4^{-/-}.** Herunterregulierte RNA-Expression (Signal log Verhältnis < minus 3) und funktionelle Zuordnung (Auswahl; Gesamttabelle B, siehe Anhang).

Bezeichnung	Signal log Verhältnis / Genotyp			Molekulare Funktion / Biologischer Prozeß (MGI Database)
	WT BL10	TLR2 ^{-/-}	TLR4 ^{-/-}	
Insulin-like growth factor binding protein 4	-4,98	-0,35	-0,52	Insulin-like growth factor binding protein 4, Regulation of cell growth
Max dimerization protein	-5,76	-2,3	0,11	Transcription regulator activity
Thymidylate kinase family LPS-inducible member	-4,62	-1,43	0,04	Thymidylate kinase activity
Met proto-oncogene	-5,34	-1,01	-1,53	Activation of MAPK activity, Protein kinase activity
Bcl2-like 1	-4,57	-1,85	-0,26	Anti-apoptosis activity
Resistin	-4,88	-3,52	0,38	Innate immune response, Homeostasis activity
Gap junction membrane channel protein beta 1	-5	-1,32	-0,24	Gap-junction forming channel activity, Cell-cell signalling
V-erb-b2 erythroblastic leukemia viral oncogene	-5,51	-2,61	-0,57	Transmembrane receptor protein
Purinergic receptor P2X, ligand-gated ion channel 4	-4,77	-1,9	-0,13	Tyrosine kinase signaling pathway
Integrin alpha 3	-5,77	-0,68	-0,08	ATP-gated cation channel activity
				Receptor activity, Integrin-mediated signaling pathway

Für die TLR4-abhängig regulierte Expression (Tab.16) konnten Gene identifiziert werden, die mit T-Zell Interaktionen assoziiert sind. TLR4-abhängig hochreguliert war hier beispielsweise der „Killer cell lectin-like receptor“, der die durch natürliche Killerzellen vermittelte Zytotoxizität negativ reguliert. Transkripte, mit einer entzündungsverstärkenden T-Zell Assoziation, wie z.B. das CD80-Antigen und das Endomucin (CD43), waren dagegen herunterreguliert. Eine negative Regulation der Endozytose ist mit einer Proteinkinase C assoziiert, die TLR4-abhängig hochreguliert war. Das Hitzeschockprotein Hsp60 hat viele Funktionen und wird bei Streß, aber auch bei immunologischen Prozessen vermehrt gebildet (Wallin et al. 2002). Hsp60 war in der vorliegenden Arbeit gering TLR4-abhängig hochreguliert, jedoch beim Wildtyp und TLR2-/- deutlich erniedrigt. In einem Hepatitis-Modell wurde beschrieben, dass Hsp60 die Th1-vermittelte Immunantwort inhibieren kann (Zanin-Zhorov et al. 2005). Als Kostimulator kann es auf regulatorische T-Zellen (Treg, CD4+CD25+) wirken und somit die adaptive Immunantwort herunterregulieren (Zanin-Zhorov et al. 2006). Proinflammatorisch assoziierte Transkripte waren dagegen herunterreguliert, z.B. ein TNF-alpha Rezeptor, eine Procollagen C-Proteinase, ein Integrin und eine 12-Lipoxygenase. Sehr interessant war auch die Herunterregulation der Matrixmetalloproteinase 13, die durch IFN-gamma aktiviert wird und damit erheblich zur Gewebeerstörung beitragen kann (Ahmad et al. 2006).

Tab. 16: **TLR4-abhängige Expression bei Ileitis (Tag acht p.i.) versus Tag null.** Regulierte RNA-Expression; Signal log Verhältnis als Anstieg >1,5 (I=Increase) oder Abstieg < minus 3 (D=Decrease) und funktionelle Zuordnung (Auswahl; Gesamttabelle C, siehe Anhang).

Bezeichnung	Signal log Verhältnis / Genotyp			Molekulare Funktion / Biologischer Prozeß (MGI Database)
	WT BL10	TLR2 ^{-/-}	I / D* TLR4 ^{-/-}	
Killer cell lectin-like receptor subfamily B member 1D	-4,08	0,97	4,46	Negative regulation of natural killer cell mediated cytotoxicity, Receptor activity
Heat shock protein, A	-2,49	-4,04	1,82	Protein folding, Response to heat
Protein kinase C and casein kinase substrate in neurons 1	-0,86	-2,54	3,08	Negative regulation of endocytosis, Cytoskeletal protein binding, Kinase activity
Matrix metalloproteinase 13	-0,69	1,52	-5,73	Collagen catabolic process, Metalloendopeptidase activity
Hyaluronan and proteoglycan link protein 2	-0,49	-2,56	-4,08	Hyaluronic acid binding, cell adhesion
Arachidonate 12-lipoxygenase	4,19	1,32	-5,1	Arachidonate 12-lipoxygenase activity, Leukotriene biosynthetic process
Transducin (beta)-like 1X-linked receptor 1	2,92	-0,63	-3,27	GTPase activity, Signal transduction
Endomucin	1,28	-3,64	-4,51	Cell adhesion, T cell binding
Integrin beta 1 (fibronectin receptor beta)	0,14	-1,04	-3,36	Integrin binding, Integrin-mediated signaling pathway
Tumor necrosis factor receptor superfamily, member 11a	-0,13	0,36	-3,53	Lymph node development, Receptor activity
Procollagen C-proteinase enhancer protein	0,45	-1,33	-3,91	Nucleic acid binding, Proteolysis
Latent transforming growth factor beta binding protein 3	0,13	-0,22	-3,48	Transforming growth factor beta receptor signaling pathway, Growth factor binding
CD80 antigen	1,11	2,05	-3,38	Receptor activity, T cell costimulation
Beta-site APP cleaving enzyme 1	-0,44	0,07	-4,53	Aspartic-type endopeptidase activity, Proteolysis

* I/D = „Increase“ oder „Decrease“ (siehe 2.10); MGI Database: <http://www.informatics.jax.org/>

3.3 DSS-Colitis bei TLR-defizienten Tieren

3.3.1 Analyse der kultivierbaren Colonflora bei TLR-defizienten Tieren

Da es sich bei der DSS-induzierten Colitis um ein anderes Organsystem und ein chemisch induziertes Entzündungsmodell, anders als bei der *T. gondii*-induzierten Ileitis handelte, sollte hier eine globale Analyse der Colonflora durchgeführt werden. Das Ziel hierbei war, mögliche entzündungsassoziierte Änderungen bakterieller Gruppen herauszuarbeiten. Die umfangreiche kulturell-mikrobiologische Analyse vom Darminhalt des Colons wurde analog durch molekulargenetische Methoden ergänzt. Die Konzentration von kommensalen *E. coli* im Colon stieg bei kranken Wildtyp-Tieren im Vergleich zu gesunden signifikant um vier logarithmische Stufen an (*p < 0.05; Abb.23A). Hingegen stieg die *E. coli*-Last bei TLR-defizienten Tieren mit DSS-Colitis weniger als bei Wildtyp-Mäusen an. Die Anzahl der Enterokokken, Laktobazillen, *Bacteroides/Prevotella* spp. und Clostridien unterschieden sich nicht signifikant zwischen Wildtyp und TLR-defizienten Tieren weder im gesunden, noch im entzündeten Zustand. *Enterococcus* spp. und *Bacteroides/Prevotella* spp. stiegen zwar tendenziell an, der Unterschied war aber nicht signifikant (Abb.23B). Die *Bacteroides*-Population setzte sich nach biochemischer Analyse und Bestätigung über 16S rRNA-Sequenzanalyse folgendermassen zusammen: *Bacteroides ovatus*, *B. merdae*, *B. uniformis*, *B. vulgatus* und *B. thetaiotaomicron*. Die *Prevotella* spp. setzten sich aus *P. oralis* und *P. buccae*, und die *Enterococcus* spp. aus *E. faecalis*, *E. faecium* und *E. gallinarum* zusammen (Abb.23).

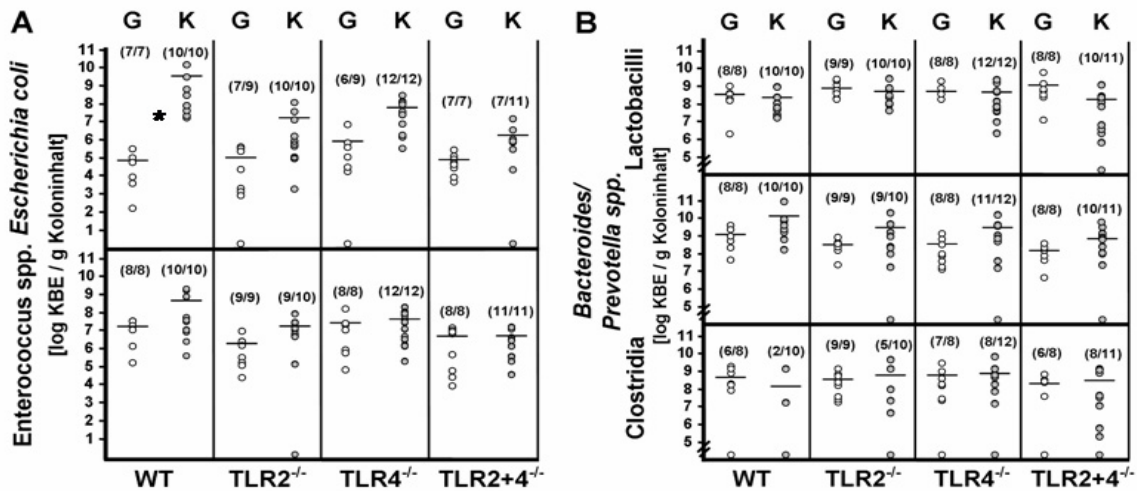


Abb. 23: Zusammensetzung der kultivierbaren Darmflora von gesunden (G, weiße Punkte) und Tieren mit schwerer Colitis (K, graue Punkte) am Tag acht nach siebentägiger DSS-Behandlung angegeben in log KBE/g Coloninhalt. (A) Dargestellt sind die Werte für *E. coli* und *Enterococcus* spp. und in (B) für *Lactobacillus* spp., *Bacteroides/Prevotella* spp. und *Clostridium* spp. Die Zahlen in Klammern geben die Anzahl der Mäuse mit Bakteriennachweis pro Anzahl aller Versuchstiere dieser Gruppe an. Angegeben sind Einzelwerte (Punkte) und Mittelwertbalken (*p < 0,05 im Vergleich zu gesunden Tieren). Daten in Kooperation mit Julia Niebergall (med. Dissertationsschrift).

Der signifikante Anstieg von *E. coli* im Wildtyp zeigte, dass auch bei der DSS-Colitis wie schon bei der *T. gondii*-Ileitis beobachtet, eine entzündungsbedingte Erhöhung der Gram-negativen Bakterienlast zu finden war.

3.3.2 Schweregrad der DSS-Colitis bei TLR-defizienten Tieren

Um den möglichen Einfluss von TLR2 und TLR4 auf die Ausprägung einer Colitis zu untersuchen, wurden C57BL/10 Wildtyp, TLR2^{-/-}, TLR4^{-/-} und TLR2+4^{-/-} defiziente Tiere im DSS-induzierten Colitismodell untersucht. Nach siebentägiger DSS-Behandlung, entwickelten die Wildtyp-tiere ausgeprägte Symptome einer Colitis bis zu einem klinischen Gesamtindex von 11 Punkten (0-12, siehe 2.3.5). Die TLR-defizienten Tiere jedoch zeigten signifikant niedrigere Werte von sieben (TLR2^{-/-} und TLR4^{-/-}) bzw. vier (TLR2+4^{-/-}) im klinischen Gesamtindex und signifikant erniedrigte IFN-gamma Werte gegenüber dem Wildtyp in Organkulturüberständen aus mesenterialen Lymphknoten (MLN). Es wurden hier die Daten für MLN dargestellt, weil sich im Colon keine signifikanten histopathologischen Unterschiede zwischen Wildtyp und TLR-defizienten Tieren ergeben hatten (siehe auch 3.3.4) und nur in den MLN signifikante Unterschiede bezüglich IFN-gamma darstellbar waren (Abb.24B).

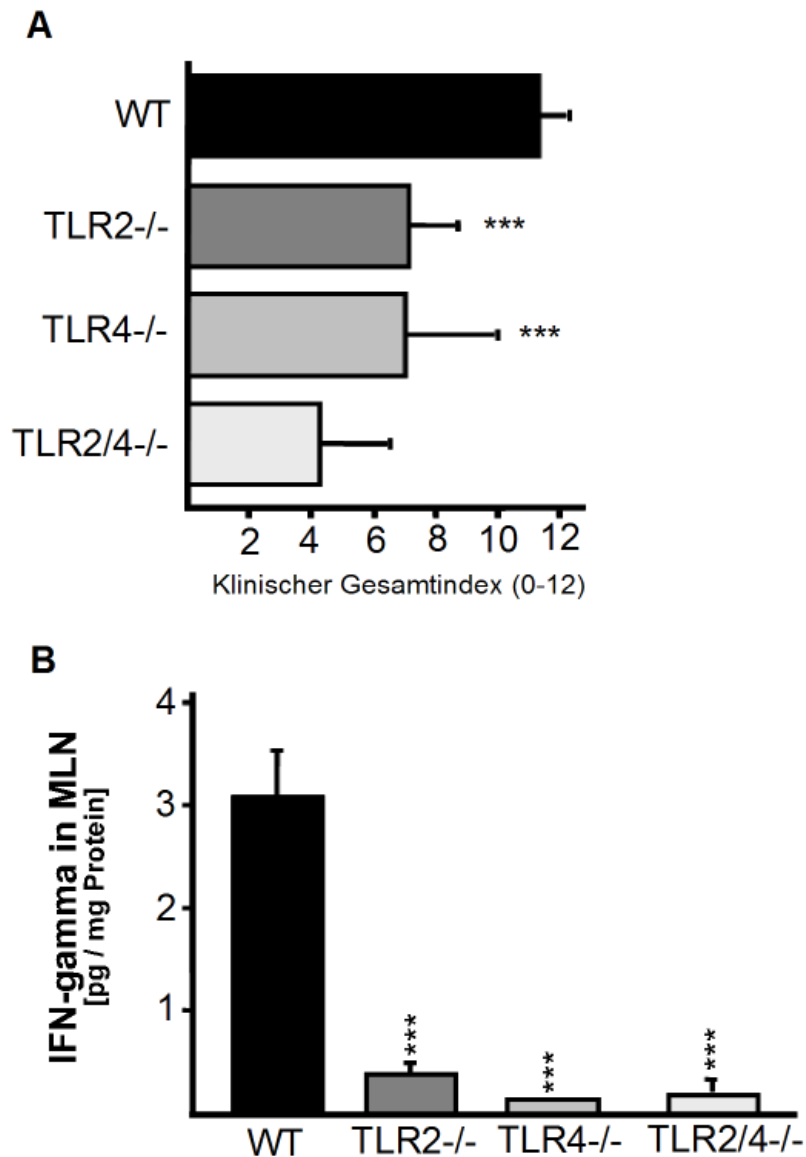


Abb. 24: Klinischer Colitisschweregrad und IFN-gamma-Werte bei Wildtyp, TLR2^{-/-}, TLR4^{-/-} und TLR2+4^{-/-} Mäusen. (A) Dargestellt ist der klinische Gesamtindex am Tag acht nach siebentägiger DSS-Behandlung: Wildtyp C57Bl/10 (schwarze Balken, n=10), TLR2^{-/-} (dunkelgraue Balken, n=10), TLR4^{-/-} (hellgraue Balken, n=12) und TLR2+4^{-/-} (weisse Balken, n=11). Die Daten stammen aus zwei unabhängigen Experimenten. (B) Dargestellt sind die IFN-gamma Konzentrationen aus Organkulturüberständen von MLN. Die MLN stammten von Wildtyp (WT, schwarze Balken, n=3), TLR2^{-/-} (dunkelgrau, n=4), TLR4^{-/-} (hellgrau, n=4) und TLR2+4^{-/-} (weiss, n=4) Mäusen mit Colitis an Tag acht (nach siebentägiger DSS-Behandlung). Die Daten stammen aus (***)p<0,001 im Vergleich zum Wildtyp).

Die reduzierten Colitissymptome waren mit verminderter entzündlicher Aktivität assoziiert, wie an den erniedrigten IFN-gamma Werten aus den MLN der TLR-defizienten Tiere im Vergleich zum Wildtyp zu erkennen war (Abb.24B). Unter Berücksichtigung der Ergebnisse zur kultivierbaren Colonflora, kann man schliessen, dass die hohen *E. coli*-Konzentrationen bei Colitis an den klinischen Schweregrad gekoppelt waren.

3.3.3 Molekulare Charakterisierung der Colonflora in TLR-defizienten Mäusen mit DSS-Colitis

Mittels PCR-DGGE wurden molekulare Fingerabdrücke der Colonflora bei gesunden und an Colitis erkrankten C57BL/10 und TLR-defizienten Tieren erstellt (Abb.25). Da bei der Colitis ausschliesslich ein signifikanter Anstieg der kultivierbaren Gram-negativen Bakterien (*E. coli*) bei Wildtyp-Tieren im Vergleich zu den TLR-defizienten Tieren beobachtet werden konnte, wurden auch molekulare Muster aus dem Coloninhalt TLR2+4-defizienter Tiere erstellt, um möglicherweise noch andere Bakteriengruppen zu detektieren, die mit dem Schweregrad der Colitis assoziiert waren. Die DGGE-Profile zeigten, dass die akute Phase der Colitis von starken Veränderungen der Darmflora begleitet wurde. Die Sequenzanalyse einzelner Banden aus den DGGE-Profilen bestätigte eine Verschiebung der Bakterienzusammensetzung zur Familie der *Enterobacteriaceae* (Abb.25A). Zudem war in den DGGE-Profilen von Mäusen mit Colitis eine reduzierte Diversität der Darmflora zu erkennen. Sequenzanalysen von DGGE-Banden deuteten an, dass nicht-kultivierbare Spezies aus der Gruppe Bacteroidales, *Bryantella* spp., *Tannerella* spp. und einige Clostridien und Laktobazillen im entzündeten Colon verschwanden (Abb.25A). Zum anderen war eine Bande, die 16S rRNA-Gene der Clostridiales repräsentierte, im entzündeten Colon im Wildtyp deutlich dominanter (Abb.25A), als im gesunden Zustand zu erkennen, was auf eine mögliche Akkumulation der entsprechenden Bakteriengruppe bei Colitis hinwies. Mit der PCR-DGGE-Analyse aus dem Coloninhalt von TLR-defizienten Tieren konnten ebenfalls Änderungen der Darmflora bei Colitis nachgewiesen werden (Abb.25B repräsentativ für TLR2^{-/-} und TLR4^{-/-}, Daten hier nicht gezeigt). Die 16S Sequenzanalyse entsprechender DNA-Banden des DGGE-Profiles bestätigte, dass Laktobazillen, die normalerweise im gesunden Colon zu finden waren, bei Entzündung durch *Enterobacteriaceae* verdrängt wurden. Ein Anstieg von nicht-kultivierbaren Clostridien, wie bei der DSS-Colitis im Wildtyp beobachtet, konnte allerdings bei den TLR-defizienten Tieren nicht verzeichnet werden (Abb.25B).

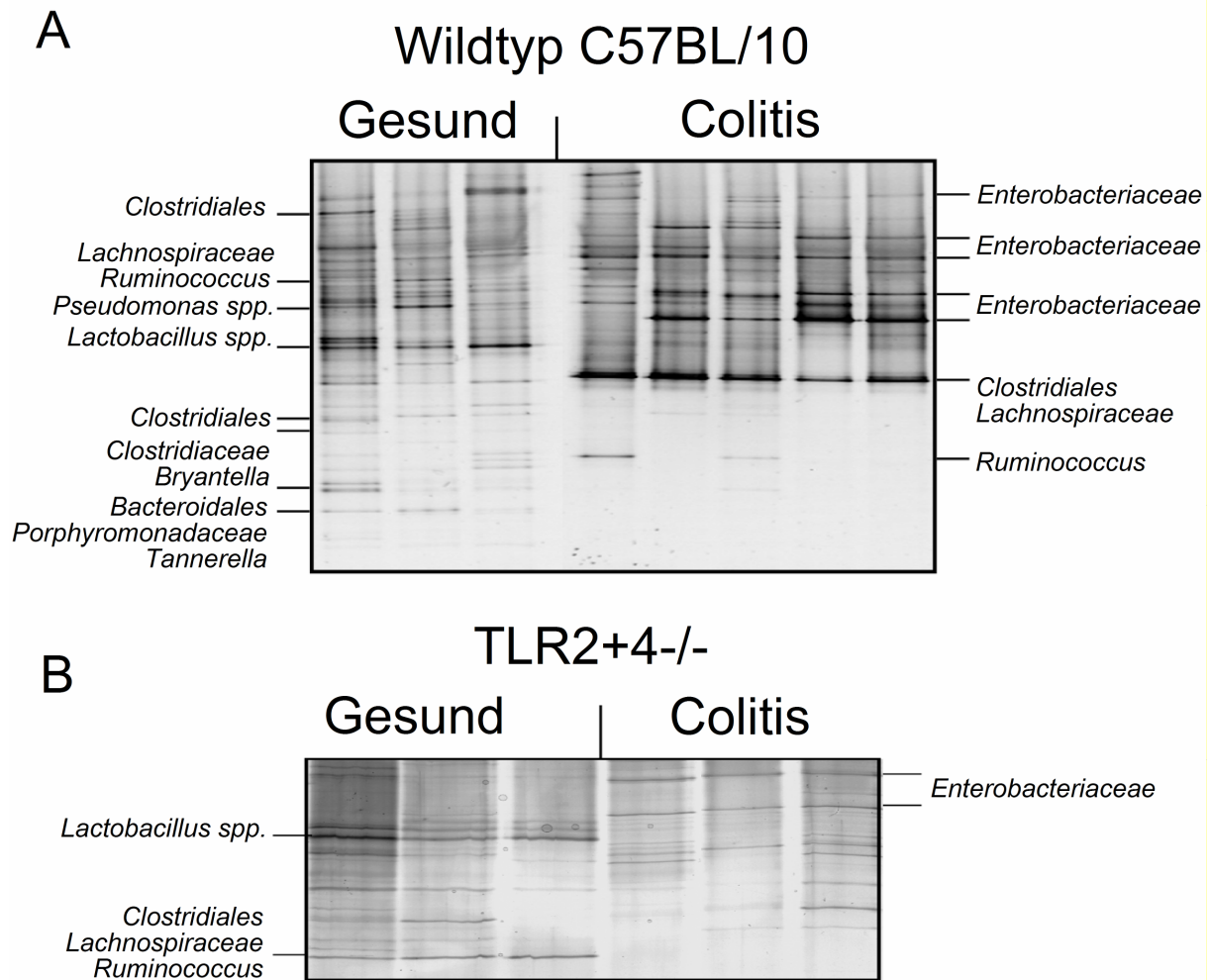


Abb. 25: DGGE (Variable 16S rRNA-Region V6-8, 16S Primer 968F-GC und 1378R) von Bakteriengemeinschaften von Wildtyp und TLR2+4-defizienten Tieren im gesunden Colon und mit Colitis. (A) Dargestellt sind die DGGE-Profile der gesunden Flora und bei Colitis (Tag acht nach siebentägiger DSS-Gabe) beim C57BL/10 Wildtyp. Die taxonomische Einordnung nach 16S rRNA-Sequenzanalyse der korrespondierenden DNA-Banden aus den DGGE-Profilen von gesunden bzw. Wildtyp-Tieren mit Colitis ist links bzw. rechts angezeigt. (B) Dargestellt sind die DGGE-Profile der Colonflora von gesunden bzw. TLR2+4^{-/-} Mäusen mit Colitis. Die DGGE-Profile aus Gesamt-DNA von Coloninhalten der TLR2^{-/-} und TLR4^{-/-} Tiere ergaben nahezu identische Muster. Die Daten von TLR2+4^{-/-} sind daher repräsentativ. Die DGGE-Profile sind repräsentativ für 3 Mäuse/Gruppe/Experiment. Die Ergebnisse stammen aus zwei unabhängigen Experimenten.

Die molekularen Daten konnten die Ergebnisse der kulturellen Analyse bestätigen, dass die DSS-Colitis von einem Anstieg der *Enterobacteriaceae* begleitet war. Zudem ist in der DGGE erkennbar, dass möglicherweise bestimmte nicht-kultivierbare Clostridien im entzündeten Colon des Wildtyps verstärkt auftraten.

3.3.4 Entwicklung einer komplexen Colonflora bei TLR-defizienten Tieren

Es sollte analysiert werden, ob eine TLR-Defizienz einen erkennbaren Einfluss auf die Zusammensetzung einer komplexen Darmflora im gesunden Colon hat. Dazu wurde die Colonflora von gesunden TLR2^{-/-}, TLR4^{-/-}- und TLR2+4^{-/-}-Tieren mit PCR-DGGE und mittels 16S rRNA-Klonbibliotheken analysiert (Abb.26). Die Versuchstiere (n=3 pro Gruppe) wurden im gleichen Alter von drei Monaten getötet und der Coloninhalt (ein Pellet) aus distalem Coloninhalt entnommen. Die bakteriellen Gemeinschaften wurden über die Erstellung und Analyse von 16S rRNA-Klonbibliotheken und 16S PCR-DGGE charakterisiert. Die Sequenzanalyse der Klonbibliotheken mit 16S rRNA-Genen und die Speziesidentifikation durch Vergleich mit Datenbankeinträgen zeigte, dass die Zusammensetzung der Darmflora in den dargestellten taxonomischen Einheiten zwischen TLR-defizienten Tieren und dem Wildtyp nicht signifikant unterschiedlich war (Abb. 26A). Dies wurde auch durch die Ergebnisse der DGGE-Analysen bestätigt. Die entsprechenden genetischen Fingerabdrücke der Colonflora von TLR2-, TLR4- und TLR2+4-defizienten Tieren waren annähernd identisch mit dem Wildtypmuster (Abb.26B). Der Vergleich von Anzahl und Bandenpositionen zwischen TLR2^{-/-}, TLR4^{-/-} und TLR2+4^{-/-} Mustern zeigte, dass das TLR2-Muster zu 100% dem Wildtypmuster entsprach. Die DGGE-Bandenmuster vom Coloninhalt TLR4- bzw. TLR2+4-defizienter Tiere waren beide zu 92% identisch im Vergleich zum Referenz-Wildtypmuster. Zwei auftretende DGGE-Banden in TLR4-defizienten Tieren waren allerdings nicht oder allenfalls schwach vorhanden (weisser bzw. grauer Pfeil links in Abb.26B). Eine Sequenzanalyse der entsprechenden 16S rRNA-Gene zeigte, dass diese DNA der *Bacteroidales*-Gruppe zugeordnet werden konnte. Um zu überprüfen, ob diese bakterielle Gruppe, repräsentiert durch diese DGGE-Banden, möglicherweise tatsächlich TLR4-abhängig abwesend war, wurde zusätzlich die Colonflora von Wildtyp und TLR-defizienten Tieren aus einer anderen Haltungseinrichtung (Einrichtung B) auf die gleiche Weise mit PCR-DGGE untersucht. Einige Bakterien im Wildtyp, repräsentiert durch die obere „*Bacteroides*“-Bande (weisser Pfeil links in Abb.26B) fehlten komplett in TLR4^{-/-} Tieren aus Einrichtung A. Im Colon von TLR4^{-/-} Tieren der Einrichtung B war diese Bande aber klar nachweisbar (weisser Pfeil rechts in Abb.26B). Dass die untere „*Bacteroidales*“-Bande (grauer Pfeil, Abb.26B) im Wildtyp-Muster auch in einem TLR4^{-/-} Tier schwach sichtbar war, wies darauf hin, dass diese Unterschiede eher auf interindividuelle Variabilitäten, als auf eine mögliche TLR4-Abhängigkeit zurückzuführen waren.

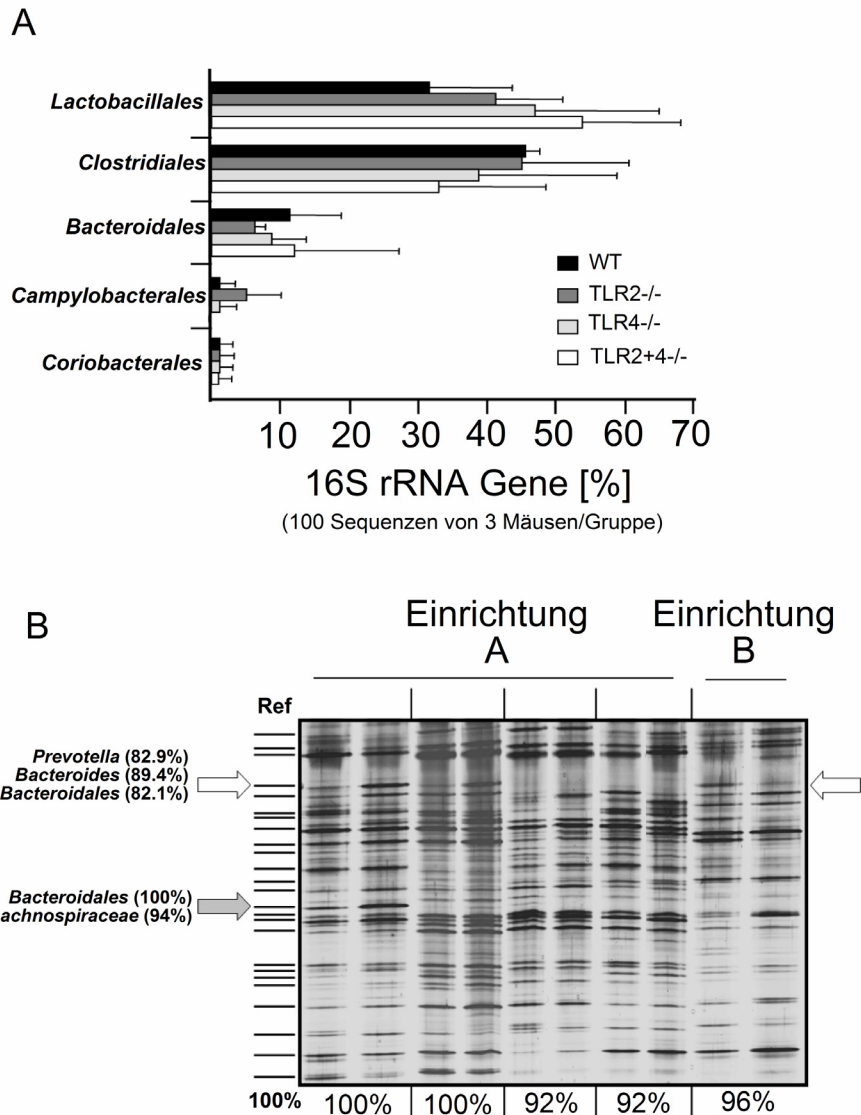


Abb. 26: Zusammensetzung der Normalflora im Colon bei Wildtyp und TLR-defizienten Tieren. (A) Dargestellt ist die Zusammensetzung der Colonflora bei gesunden C57BL/10, TLR2^{-/-}, TLR4^{-/-} und TLR2+4^{-/-} Mäusen (drei Monate alt) mittels Analyse von 16S rRNA-Genbibliotheken. Die kompletten 16S rRNA-Gene wurden aus der Gesamt-DNA des Coloninhalts amplifiziert (n=3 pro Gruppe; 100 Klonsequenzen pro Gruppe). Die Balken repräsentieren den prozentualen Anteil der taxonomischen Gruppen auf der Y-Achse. Angegeben sind Mittelwerte+Standardabweichung (nicht signifikant). (B) Dargestellt sind die individuellen 16S rRNA DGGE-Profile (Primer HDA1GC und HDA2, 16S rRNA V2-3 Region) aus der Colonflora bei Wildtyp-, TLR2^{-/-}, TLR4^{-/-} und TLR2+4^{-/-}-Mäusen (n=2/Gruppe). Die Mäuse stammten aus zwei unterschiedlichen Tierhaltungen (Einrichtung A/B). Angezeigt ist die korrespondierende 16S rRNA-Sequenzanalyse schwach sichtbarer oder fehlender DNA-Banden aus den DGGE-Profilen von TLR4^{-/-} und TLR2+4^{-/-} Tieren (weisse, graue Pfeile) mit % Ähnlichkeit zum nächsten Datenbankeintrag (links angezeigt). Auf der X-Achse ist % Ähnlichkeit zur Wildtyp-Referenz (=100%) angegeben. Die DGGE-Profile sind repräsentativ für drei Tiere/Gruppe/Experiment. Die Ergebnisse stammen aus zwei unabhängigen Experimenten.

Die Ergebnisse der molekularen Analysen gaben keinen Hinweis darauf, dass die Zusammensetzung der normalen Colonflora im Vergleich zum Wildtyp durch eine TLR2- oder TLR4-Defizienz beeinflusst wurde.

3.4 Veränderungen der Mausemagendarmflora bei *H. pylori*-Infektion

3.4.1 Analyse der bakteriellen Diversität im Mausemagendarm bei *H. pylori*-Infektion

Um den Einfluss einer *H. pylori*-Infektion auf die Diversität der bakteriellen Mausemagendarmflora zu untersuchen, wurden 16S rRNA-Klonbibliotheken analysiert. Die Klonbibliotheken wurden durch Klonierung amplifizierter 16S rRNA-Gene aus Gesamt-DNA-Extrakten der Mägen von je einer *H. pylori*-infizierten bzw. PBS-behandelten Maus erstellt und über Hybridisierung mittels spezies-/gattungsspezifischer Sonden analysiert (siehe 2.7). Die bakterielle Diversität im Mausemagendarm stieg bei einer etablierten *H. pylori*-Infektion an. Der Anteil von Laktobazillen war im gesunden Zustand mit über 60% von 30 Klonsequenzen deutlich höher als in *H. pylori*-infizierten Tiere mit 33% von 35 Klonsequenzen (Abb.27).

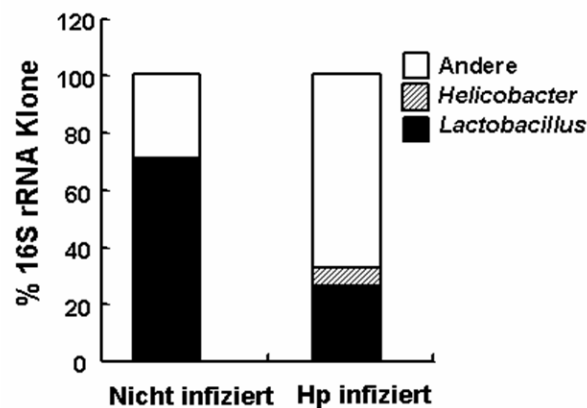


Abb. 27: Florenveränderung nach *H. pylori*-Infektion im Magen von Balb/c Mäusen. Dargestellt ist die Analyse von 16S rRNA-Klonbibliotheken durch Dot-Blot-Hybridisierung mit spezies-/gattungsspezifischen Sonden bei einer *H. pylori*-infizierten Maus (n=35 Klonsequenzen) und von einem PBS-behandelten Kontrolltier (n=30 Klonsequenzen). Angegeben ist der Prozentanteil der 16S-Klonsequenzen am Gesamt-„Pool“ nach Detektion durch *Lactobacillus*-spezifischer (Lac-141, schwarze Balken) und *H. pylori*-spezifischer Sonde (Hpy-1, graue Balken) oder keine Hybridisierung mit Lac-141 und Hpy-1 (weisse Balken).

Die bei einer gesunden Normalflora prädominanten Laktobazillen wurden nach einer *H. pylori*-Infektion im Magen durch eine Vielfalt anderer Spezies verdrängt (Abb.27/28, Tab.17).

3.4.2 Einfluss einer Salmonella-Lebendvakzine auf die *H. pylori*-induzierten Änderungen der Magenflora

Um den Effekt der *H. pylori*-Infektion auf die Mausemagendarmflora zu bestätigen und den möglichen Einfluss einer prophylaktischen Vakzinierung zu untersuchen, wurde die Magenflora analog bei *H. pylori*-infizierten Mäusen untersucht, die mit der Lebendvakzine

Salmonella enterica typhimurium Stamm SL3261 (pYZ97) immunisiert worden waren. Diese gentechnisch veränderten Salmonellen exprimierten die *H. pylori*-Urease-Untereinheiten A und B. Die kultivierbare *H. pylori*-Last war bei immunisierten Tieren signifikant reduziert (Daten hier nicht gezeigt, Aebischer *et al.* 2006). Es wurden vier Gruppen untersucht: mit H.p.-Infektion, immunisiert mit bzw. ohne H.p.-Infektion und Tiere nach Gabe des plasmidfreien (pYZ97) *Salmonella* Träger-Stamms mit anschliessender H.p.-Infektion. Der Effekt der Vakzinierung auf die Diversität der Magenflora wurde über die Analyse der 16S rRNA-Klonbibliotheken bestimmt. Aus jeder Behandlungsgruppe wurde eine Klonbibliothek konstruiert und der Anteil von *Lactobacillus*-16S Genen über Dot-Blot-Hybridisierung mit einer *Lactobacillus*-spezifischen Sonde ermittelt. Die Analyse zufällig ausgewählter Klone aus einer individuellen Klonbibliothek jeder Behandlungsgruppe ergab, dass *Lactobacillus* sp. mit einem Anteil von 97% die Magenflora immunisierter bzw. nicht-*H. pylori*-infizierter Mäusen dominierte (Abb.28 und vergleiche Abb.27). In den nicht-immunisierten *H. pylori*-infizierten Mäusen wurde der Anteil von *Lactobacillus* sp. dagegen auf weniger als 30% am Gesamt-Genpool gesenkt. Die Frequenz von *H. pylori* bzw. anderen Bakterienspezies, stieg auf einen Anteil von 32% bzw 46% am Gesamt-Pool (Abb.28).

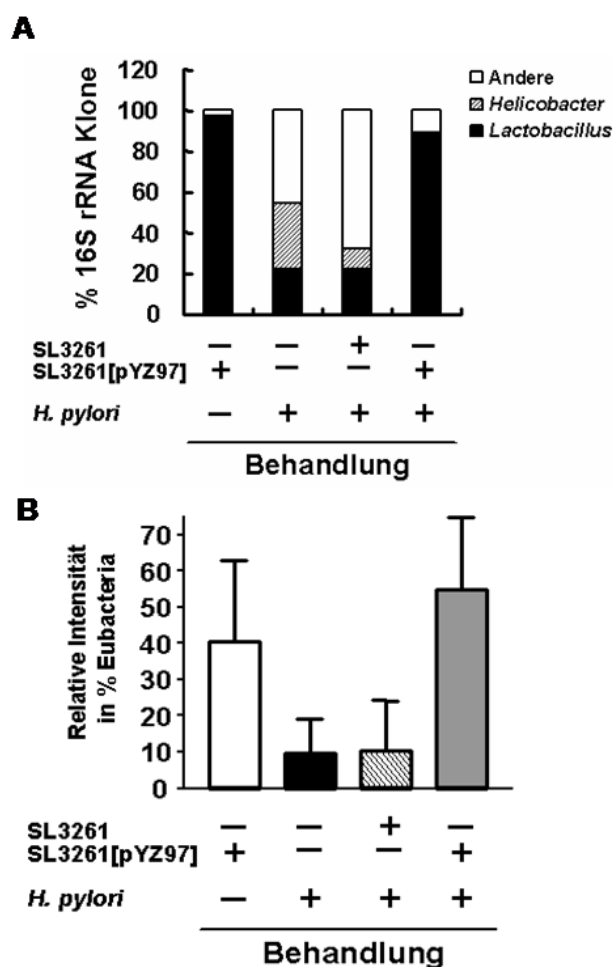


Abb. 28: Auswirkungen der Immunisierung auf die *H. pylori*-induzierten Änderungen der Magenflora. (A) Dargestellt sind die Daten aus 16S rRNA-Klonbibliotheken von einem Tier pro Versuchsgruppe (n=1). Die Analyse von 16S rRNA-Klonbibliotheken durch Dot-Blot-Hybridisierung mit spezies-/gattungsspezifischen Sonden ist als relativer Prozentanteil der 16S Klonsequenzen am Gesamt-Genpool nach Detektion durch *Lactobacillus*-spezifische (schwarze Balken) und *H. pylori*-spezifischer Sonde (graue Balken) bzw. ohne Hybridisierung mit Lac-141 und Hpy-1 (weisse Balken) dargestellt. Angegeben ist die Anzahl analysierter Klone aus 16S rRNA-Klonbibliotheken von Tieren mit/nach: Immunisierung ohne H.p.-Infektion (n=67), *H. pylori*-Infektion (n=60), Gabe des SL3261-Trägerstamms und *H. pylori*-Infektion (n=77), Immunisierung mit *H. pylori*-Infektion (n=75). (B) Analyse des relativen Anteils von *Lactobacillus* spp. 16S rRNA durch quantitative Echtzeit PCR. Auf der Y-Achse ist die Signalintensität von *Lactobacillus* (in %) im Verhältnis zum eubakteriellen Signal (=100%) dargestellt. Die quantitative RT-PCR erfolgte aus Gesamt-DNA Extrakten von Mägen (jeweils n=2 pro Gruppe) (***p<0,001; 2-Wege-ANOVA)

Nach prophylaktischer Immunisierung gegen die *H. pylori*-Urease A/B konnten *H. pylori*-infektionsinduzierte Änderungen der Magenflora verhindert werden. Der Anteil der ursprünglich vorherrschenden Laktobazillen in der Magenflora blieb somit erhalten. Um die Bakterien zu identifizieren, die den Magen von *H. pylori*-infizierten Mäusen kolonisierten, wurden alle klonierten 16S rRNA-Gene aus den Klonbibliotheken der verschiedenen Behandlungsgruppen (siehe Abb.28), die weder mit der *Lactobacillus*-spezifischen noch mit der *H. pylori*-spezifischen Sonde hybridisierten, sequenziert (91 von 279 Klonsequenzen). Es wurden 69 (von insgesamt 91) eindeutige Sequenzen generiert. Der Vergleich von Datenbankeinträgen mit öffentlichen Datenbanken zeigte, dass sich die Magenflora von *H. pylori*-infizierten Mäusen aus folgenden Bakteriengruppen zusammensetzte: *Clostridium coccoides* Gruppe, *Clostridium* spp., *Bacteroides/Prevotella* spp., *Eubacterium* spp., *Ruminococcus* spp., *E. coli*, *Streptococcus* spp. and *Lactococcus* spp. (Tab.17). Sequenzen von bisher nicht kultivierbaren Bakterien stellten einen Anteil von 59 % dar. Zwei einzelne Sequenzen aus der Klonbibliothek von nicht-immunisierten (mit dem *Salmonella* Trägerstamm SL3261 behandelten) Mäusen mit H.p.-Infektion mit 99% eine Übereinstimmung mit einer neu beschriebenen *Helicobacter*-Spezies. Diese ist in der Lage, Colitis und Typhlitis in IL-10 defizienten Mäusen auszulösen (Fox et al. 1999). Die Sequenzanalyse der 16S rRNA-Klonbibliotheken ergab, dass aus den Klonbibliotheken von immunisierten bzw. nicht-H.p.-infizierten Mäusen, *Lactobacillus*-Sequenzen identifiziert werden konnten, die nicht mit der *Lactobacillus*-spezifischen Sonde hybridisierten. Die korrespondierenden 16S rRNA-Gene wiesen Einzelnukleotidveränderungen in der Bindungsstelle der Sonde auf. Die Ergebnisse zeigten, daß die *H. pylori*-induzierten Veränderungen der bakteriellen Diversität im Mausmagen durch eine Präsenz von Spezies charakterisiert wurde, die normalerweise auf distale Abschnitte des Intestinaltraktes beschränkt sind.

Tab. 17: Molekulare Identifikation von Bakterienspezies im Mausmagen.

* Nicht-immunisierte Tiere wurden mit dem *Salmonella*-Träger-Stamm SL3261 behandelt. Das Plasmid trug dabei keine Gene für die Untereinheit der *H. pylori* Urease.

Mausgruppe	Datenbank Nummer	Datenbankeintrag	Sequenz [%]	Identische Klone	Eng verwandte Gruppe / Gattung / Spezies
Infiziert, Nicht immunisiert*	AF371582	Uncultured bacterium clone p-57-a5	92	8	<i>Clostridium coccoides</i> group OTU-70
	AF371633	Uncultured bacterium clone p-2186-s959-3	95	2	<i>Clostridium coccoides</i> group OTU-61
	AF371583	Uncultured bacterium clone p-389-o3	93	1	<i>Clostridium coccoides</i> group OTU-215
	AF371673	Uncultured bacterium clone p-1321-a5	91	1	<i>Clostridium coccoides</i> group OTU-293
	AJ418949	Uncultured bacterium clone k010.	98	1	<i>Clostridium coccoides</i> group OTU-390
	AF371579	Uncultured bacterium clone p-4162-6Wa5	93	1	<i>Clostridium coccoides</i> group OTU-343
	AJ419018	Uncultured bacterium clone kl046	99	4	<i>Clostridium coccoides</i> group OTU-235 <i>Eubacterium hallii</i>
	AB062773	Uncultured bacterium BCf1-16	90	1	<i>Ruminococcus</i> sp. OUT-227
	AF371888	Uncultured bacterium clone p-828-a5	93	1	<i>Prevotella</i> sp. OTU-19
	AJ400242	Uncultured bacterium clone S30-5	95	2	<i>Bacteroides distasonis</i> S30-5
	AJ400236	Uncultured bacterium clone F3.	90	3	<i>Bacteroides forsythus</i> F3
	AJ419055	Uncultured bacterium clone kl115	98	1	<i>Bacteroides forsythus</i> F3
	AJ408963	Uncultured bacterium clone HuCA7.	96	2	<i>Bacteroides putredinis</i> adhufec73
	AJ408997	Uncultured bacterium clone HuCB23.	95	2	<i>Bacteroides putredinis</i> adhufec73
	AB094160	Uncultured bacterium clone HuCA19	96	1	<i>Ruminococcus productus</i>
	Aj408969	Uncultured bacterium clone HuCA17	90	1	<i>Clostridium indolis</i>
	AF157054	<i>Eubacterium plexicaudatum</i> ASF492	92	1	<i>Eubacterium plexicaudatum</i> ASF492
	AF157051	Bacterium ASF500 16S ribosomal RNA	98	1	<i>Clostridium</i> sp. ASF500
	AF157052	<i>Clostridium</i> sp. ASF356	91	1	<i>Clostridium</i> sp. ASF356
	AJ011522	<i>Eubacterium ramulus</i>	92	3	<i>Eubacterium ramulus</i>
	AF202259	<i>Eubacterium oxidoreducens</i> strain G2-2	90	1	<i>Eubacterium oxidoreducens</i> strain G2-2
	Y10584	<i>Clostridium</i> sp. 16S rRNA	89	1	<i>Clostridium</i> sp. 16S rRNA
	X76163	<i>Clostridium aerotolerans</i> 16S	92	1	<i>Clostridium aerotolerans</i>
	AF127912	<i>Helicobacter</i> sp.	99	2	<i>Helicobacter</i> sp.

Mausgruppe	Datenbank Nummer	Datenbankeintrag	Sequenz [%]	Identische Klone	Eng verwandte Gruppe / Gattung / Spezies
Infiziert Immunisiert	AJ308392	Uncultured bacterium clone S25-5	99	1	<i>Lactobacillus reuteri</i> S25-5
	X76328	<i>Lactobacillus reuteri</i> (DSM 20016 T)	98	1	<i>Lactobacillus reuteri</i> S25-5
	AF371506	Uncultured bacterium clone p-29-a5	94	1	<i>Streptococcus alactolyticus</i> OTU-180
	AY017059	<i>Lactobacillus sp.</i> CLE-4	99	1	<i>Lactobacillus sp.</i>
Nicht-infiziert Immunisiert	AF157049	<i>Lactobacillus murinus</i> 16S	99	1	<i>Lactobacillus murinus</i>
	AJ308392	Uncultured bacterium clone S25-5	96	1	<i>Lactobacillus reuteri</i>
Infiziert	AF352166	<i>Lactococcus garvieae</i> strain FLG12 16S	97	2	<i>Lactococcus garvieae</i>
	AF233451	<i>E.coli</i> 16S rRNA gene	98	5	<i>E. coli</i>
	U01331	<i>Helicobacter pylori</i> isolate MC937	99	2	<i>Helicobacter pylori</i>
	AF127912	<i>Helicobacter sp.</i>	98	1	<i>Helicobacter sp.</i>
	AF157049	<i>Lactobacillus murinus</i> 16S	99	5	<i>Lactobacillus murinus</i>
	AF371575	Uncultured bacterium clone p-1921- s962-3	91	1	<i>Clostridium coccoides</i> group OTU-40
	AF371875	Uncultured bacterium clone p-2190- s959-3	92	1	<i>Clostridium coccoides</i> group OTU-61
	AJ400242	Uncultured bacterium clone S30-5	95	1	<i>Bacteroides distasonis</i> S30-5
	AJ400241	Uncultured bacterium clone S30-4	95	1	<i>Bacteroides distasonis</i> S30-4
	AJ400236	Uncultured bacterium clone F3	91	1	<i>Bacteroides forsythus</i> F3

4 Diskussion

4.1 Die *T. gondii*-induzierte Ileitis als Darmentzündungsmodell

4.1.1 Eigenschaften und Vorzüge des Modells

Die *T. gondii*-induzierte Ileitis ist ein Modell für eine akute Dünndarmentzündung. Nach oraler Infektion mit 100 Zysten *T. gondii* (Stamm ME49) wird bei suszeptiblen C57BL-Mäusen eine akute terminale Ileitis ausgelöst. Aufgrund einer nachfolgenden ausgeprägten Immunreaktion gekennzeichnet durch den Anstieg von aktivierten CD4⁺ T-Zellen, IFN-gamma, TNF-alpha und induzierbarer NO-Synthase (iNOS) versterben diese Tiere acht bis neun Tagen nach der Infektion. Die Histopathologie des entzündeten terminalen Ileums ist durch eine massive Zerstörung der Villi und der Mukosa gekennzeichnet (Liesenfeld *et al.* 1996, 1999ab; Mordue *et al.* 2001; Liesenfeld 2002; Kasper *et al.* 2004; Mennechet *et al.* 2004; Robben *et al.* 2004). Die Daten der vorliegenden Arbeit konnten diese Ergebnisse in den hier untersuchten Parametern bestätigen. C57BL/6-Mäuse mit *T. gondii*-Infektion zeigten eine ausgeprägte Histopathologie mit transmuraler Zerstörung und Nekrosen (Abb.8). Bei *T. gondii*-infizierten C57BL-Mäusen konnten im Vergleich zu gesunden Mäusen reproduzierbar erhöhte IFN-gamma und NO-Werte (Abb.16,17C/D, 20A/B), sowie eine erhöhte Anzahl von aktivierten CD4⁺ T-Zellen detektiert werden (Heimesaat *et al.* 2006). RNA-Expressionsdaten des entzündeten Ileums im Vergleich zum gesunden Zustand deuteten an, dass Transkripte, sowohl proinflammatorisch wie z.T. auch antiinflammatorisch kategorisierter Gene bei *T. gondii*-infizierten C57BL10-Wildtyp Mäusen hochreguliert waren (siehe 3.2.6). Einige proinflammatorische Transkripte waren bei den TLR4-defizienten Tieren herunterreguliert, z.B. ein TNF-alpha Rezeptor oder die Matrixmetalloproteinase 13, was möglicherweise mit der geringeren Entzündungsausprägung bei TLR4-defizienten Tieren korreliert. In einem Übersichtsartikel von Buzoni-Gatel & Werts (2006) werden mögliche Mechanismen des Eindringens von *T. gondii* durch das Darmepithel und die Interaktionen mit Zellen des Immunsystems bzw. Komponenten der angeborenen Immunantwort genannt (Abb.29).

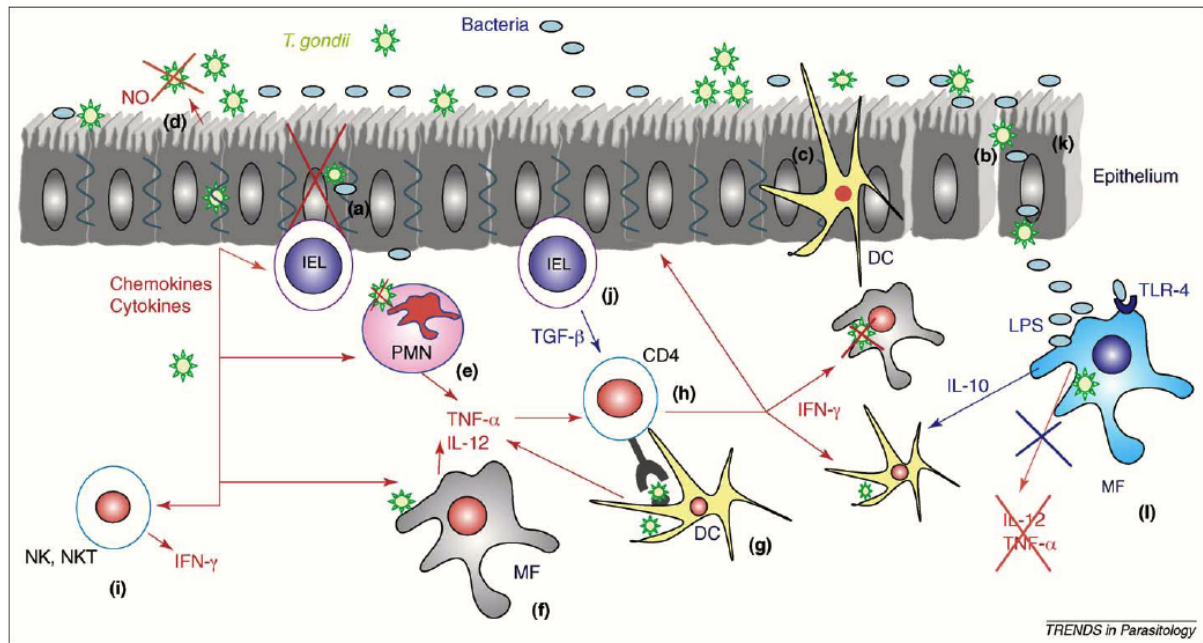


Abb. 29: Entnommen aus Buzoni-Gatel & Werts 2006; *Toxoplasma gondii* überwindet das intestinale Epithel des Wirtes durch direkte Infektion von Enterozyten (a), durch Eindringen in „tight junctions“ (b), oder nach Aufnahme durch DCs (c). Wenn Enterozyten mit dem Parasiten infiziert sind, treten physiologische und morphologische Veränderungen auf, die zur Freisetzung von zytotoxischen Molekülen wie NO führen können (d). Zusätzlich können Enterozyten auf die Infektion mit der Sekretion von Chemokinen und Zytokinen reagieren, die PMNs (e), Makrophagen (f) und DCs (g) anlocken. Diese Zellen können im aktivierten Zustand eine direkte abtötende Wirkung entfalten und als Quelle für Zytokine dienen, wie z.B. IL-12, welches die adaptive Immunantwort über CD4-Zellen anstößt (h). Für die Auslösung einer spezifischen Immunantwort wird eine Antigen-Präsentation benötigt, meist durch DCs. Aktivierte T-Zellen und NK und NKT (i) können nach Stimulation durch Zytokine, sekretiert von infizierten Enterozyten, IFN-gamma ausschütten. Dies aktiviert Makrophagen, DCs und Enterozyten zur Bekämpfung der Parasiten. IEL (j) wirken zytotoxisch auf Enterozyten und produzieren TGF-beta, was möglicherweise die IFN-gamma Produktion abschwächt. Die Replikation der Parasiten im Darm kombiniert mit der inflammatorischen Antwort führt zu einem Epithelschaden, der es kommensalen Bakterien, einschliesslich LPS-reicher Gram-negativer Spezies, ermöglicht, die Epithelbarriere zu überwinden (k). *T. gondii* blockiert offenbar einige LPS-induzierbare Zytokine (l) und zytokin-abhängige Gene von *in vitro* infizierten Makrophagen (Lee *et al.* 2006).

Die in Abb.29 beschriebene Translokation kommensaler Gram-negativer Bakterien und insbesondere die nachfolgende Wirkung des LPS als TLR4-Ligand konnte auch in der vorliegenden Arbeit beobachtet werden (siehe 4.1.2, 4.2). Der Nachweis von Bakterien im entzündeten subepithelialen Gewebe durch FISH hatte bereits in Vorarbeiten bestätigt, dass die *T. gondii*-induzierte Ileitis von einem ausgeprägten Barrieredefekt begleitet ist, der zur Translokation von Bakterien in subepitheliale Bereiche führt (Daten hier nicht gezeigt; Heimesaat *et al.* 2006). Die Beobachtung, dass lebende *E. coli*, nicht aber *Bacteroides/Prevotella* spp., durch Kultivierung in mehr als 80% der mesenterialen Lymphknoten und in 70% der Milzen von Mäusen mit schwerer Ileitis nachgewiesen werden konnten (Daten hier nicht gezeigt), deutet darauf hin, dass translozierende Darmbakterien die Gewebeerstörung und die Entzündung durch direkten Zellkontakt

und Freisetzung von Immunmediatoren verstärken (Khan *et al.* 1997; Liesenfeld *et al.* 1999ab). Die bei der *T. gondii*-induzierten Ileitis beschriebenen histopathologischen Veränderungen während der Entzündung, die Sekretion des proinflammatorischen Zytokins IFN-gamma, die Sekretion von NO, die nachgewiesene Translokation von Bakterien und der Anstieg von aktivierten CD4+ T-Zellen (Heimesaat *et al.* 2006) bekräftigen, dass dieses Modell am ehesten einen M. Crohn im akuten Schub simuliert. Die Vorzüge der *T. gondii*-induzierten Dünndarmentzündung liegen in der über viele Versuchsreihen nachgewiesenen Reproduzierbarkeit der terminalen Ileitis und der damit verbundenen immunpathologischen Veränderungen. Da die Ileitis bei suszeptiblen C57BL-Mäusen, bei den hier verwendeten C57BL/6 und BL10 mit nur geringen Unterschieden, auslösbar war und auch fast identische Florenverschiebungen (4.1.2) bei beiden Wildtypen nachweisbar waren, können somit mögliche Auswirkungen von TLR-Defekten auf die Ileitis und Darmfloraveränderungen untersucht werden. In dieser Arbeit wurden Tiere mit einem TLR2- und/oder TLR4-Defekt untersucht, denkbar ist auch eine Analyse z.B. bei TLR9-defizienten Tieren im BL6-Hintergrund. Ein weiterer Vorteil liegt in der kurzen Zeit, in der die pathologischen Veränderungen eintreten. Ab Tag sechs p.i. sind infektionsbedingte Veränderungen im Darm, histopathologisch und in der Darmflora, erkennbar, wobei die Tiere am Tag acht bis neun p.i. versterben. Beim Samp/Yit(Fc)-Modell (s.unten) treten pathologische Veränderungen dagegen erst nach Wochen auf (Kosiewicz *et al.* 2001; Bamias *et al.* 2002). Aufgrund der experimentellen Reproduzierbarkeit und der klar beschriebenen entzündungsbedingten Veränderungen der Darmflora (siehe auch 4.1.2) und der klinischen Parameter, ist die *T. gondii*-induzierte Ileitis als ein wertvolles Darmentzündungsmodell anzusehen für die Analyse pathogenetischer Faktoren und die Erprobung therapeutischer Ansätze z.B. durch Modulation der Darmflora über Probiotika oder Prebiotika oder die Anwendung von TLR4-Antagonisten. Es existieren nur wenige Tiermodelle, in denen eine Dünndarmentzündung beschrieben wird (Pizarro *et al.* 2003; Elson *et al.* 2005). Die bisher beschriebenen Modelle, z.B. die Entwicklung einer spontanen Dünndarmentzündung bei der Samp/Yit(Fc)-Maus (Kosiewicz *et al.* 2001; Bamias *et al.* 2002) konnten zwar belegen, dass sich ausschliesslich bei den mit SPF-Flora rekolonisierten Samp/Yit-Mäusen im Vergleich zur gnotobiotischen Kontrollgruppe eine Dünndarmentzündung entwickelte (Kosiewicz *et al.* 2001) bzw., dass die Behandlung mit Ciprofloxacin/Metronidazol eine Abschwächung der Immunreaktion herbeiführt (Bamias *et al.* 2002). Eine grundlegende Analyse der Darmflora ist bei diesem Modell aber nicht beschrieben, obwohl der essentielle Beitrag bestimmter Guppen der kommensalen Flora zur Induktion einer inflammatorischen Reaktion bei Tiermodellen zur Darmentzündung bekannt ist (Rath *et al.* 1996; Dianda *et al.* 1997; Sartor 1997; Sellon *et al.* 1998; Onderdonk *et al.* 1998; Schultz *et al.* 1999; Hans *et al.* 2000a; Waidmann *et al.* 2003; Schuppler *et al.* 2004; Lucke *et al.* 2006) und auch die Abmilderung von Darmentzündung durch die Gabe von probiotisch wirksamen Bakterien oder bakteriellen Produkten in neuesten Arbeiten

beschrieben wurde (Madsen *et al.* 2001, Madsen 2001,2006; Gionchetti *et al.* 2000; Floch *et al.* 2006; Ewaschuk *et al.* 2006ab; Rioux *et al.* 2005; Rioux & Fedorak 2006; Bibiloni *et al.* 2005a). In dem in dieser Arbeit beschriebenen *T. gondii*-induzierten Dünndarmentzündungsmodell wurde daher eine umfassende Analyse der Darmflora durchgeführt und die Auswirkung einzelner kommensaler Bakterienspezies auf die Induktion einer Immunpathologie im Ileum untersucht.

4.1.2 Der Einfluss von Bakterien im *T. gondii*-induzierten Ileitis-Modell

Die Dünndarmentzündung nach *T. gondii*-Infektion ist ein Modell bei dem es im Verlauf der Entzündung reproduzierbar zu einer erheblichen Einschränkung der bakteriellen Diversität und einem Anstieg der kommensalen Gram-negativen Darmflora in Form von *E. coli* und *Bacteroides/Prevotella* spp. kommt. Andere Bakteriengruppen wie z.B. anaerobe Gram-positive Stäbchen waren im entzündeten Dünndarm kaum noch nachweisbar im Vergleich zum gesunden Zustand (Abb.8A). Diese Erkenntnisse werden durch die umfangreichen Ergebnisse dieser Arbeit zur kultivierbaren Darmflora, ergänzt durch molekulare Daten, bekräftigt. Eine reduzierte Diversität der Darmflora und erhöhte Anzahl an Gram-negativen Bakterien beim Menschen wurde in entzündeten Darmabschnitten von CED-Patienten beobachtet (Martin & Rhodes 2000; Masseret *et al.* 2001; Barnich *et al.* 2003; Seksik *et al.* 2003; Darfeuille-Michaud *et al.* 2004; Swidsinski *et al.* 2005). Dieselben Bakteriengruppen stehen im Verdacht, eine GvHD beim Menschen auszulösen (Beelen *et al.* 1999). Eine Überwucherung des Ileums mit Enterobakterien, wurde auch für den Zustand nach Leberresektion, bei Portalvenenobstruktion, bei längerer parenteraler Ernährung und bei reduzierter Darmmotilität beschrieben (Tarpila *et al.* 1993; Wang *et al.* 1994; Leveau *et al.* 1996; Kayama *et al.* 2000; Husebye 2005). Dies weist darauf hin, dass das Überwachsen mit Bakterien am ehesten als Folge einer gestörten Dünndarmphysiologie zu werten ist. Die Beobachtung, dass offensichtlich besonders Gram-negative Bakterien im Verdacht stehen, an der Entzündungsauslösung beteiligt zu sein, führte zur Idee der Gabe von Antibiotika, um diesen Effekt zu verringern. Unter Berücksichtigung des Wirkungsspektrums der angewandten Antibiotika, konnten indirekt Rückschlüsse auf die an der inflammatorischen Antwort beteiligten Bakterien gezogen werden. Dieser Ansatz wurde nach der umfassenden Analyse der Darmflora im gesunden und entzündeten Darm auch bei der *T. gondii*-induzierten Ileitis verfolgt. Die Behandlung mit Ciprofloxacin/Metronidazol führte dabei zu einer signifikanten Reduktion von *E. coli* und *Bacteroides/Prevotella* spp. (3.1.4; Tab.13), was von einer Steigerung der Überlebensrate der behandelten Tiere, niedrigeren Werten für IFN-gamma und NO und einer abgemilderten Histopathologie im Ileum begleitet war (Abb.14/15/16). Eine prophylaktische Gabe von Ciprofloxacin und Metronidazol fünf Tage vor der *T. gondii*-Infektion war dabei effektiver als eine therapeutische Intervention nach etablierter Ileitis (Abb.14). Die Abmilderung der *T. gondii*-Ileitis durch den Einsatz von Darmflora eradizierenden Antibiotika, wie Ciprofloxacin und Metronidazol, zeigte den

Einfluss intestinaler Bakterien auf die Ausprägung der Immunpathologie. Diese Ergebnisse stehen im Einklang mit der Verbesserung der Ileitis bei Antibiotika-behandelten SAMP/Yit(Fc) Mäusen (Kosiewicz *et al.* 2001; Bamias *et al.* 2002). Der Schutz vor bzw. die Abmilderung der Ileitis durch antibiotische Behandlung, wie in dieser Arbeit dargestellt, zeigte, dass *E. coli* und *Bacteroides/Prevotella* spp. den immunpathologischen Schweregrad dieser akuten murinen Ileitis verstärken können. Das vorherrschende Auftreten von *E. coli* und *Bacteroides/Prevotella* spp. bei experimenteller Colitis bzw. bei Patienten mit CED wurde bereits beschrieben (Onderdonk *et al.* 1998; Schuppler *et al.* 2004; Swidsinski *et al.* 2005). Ein colitogenes Potential beider Bakteriengruppen (Rath *et al.* 1999ab, 2001; Waidmann *et al.* 2003) und der Beitrag Gram-negativer Bakterien zum Schweregrad der intestinalen Entzündung wird durch die erfolgreiche Behandlung mit Antibiotika bei experimenteller Colitis, und CED bzw. GvHD beim Menschen untertützt (Greenbloom *et al.* 1998; Madsen *et al.* 2000; Hoentjen *et al.* 2003; Beelen *et al.* 1999). Es kann jedoch nicht ausgeschlossen werden, dass sich mögliche immunmodulatorische Wirkungen der Antibiotika bei der Behandlung der *T. gondii*-induzierten Ileitis günstig auf die Immunpathologie auswirkten, wie z.B. bei Fluorchinolonen (Ciprofloxacin). Diese können *in vitro* die Bildung von IL-2 induzieren und inhibierend auf die Synthese von Interleukin-1 und TNF-alpha wirken. *In vitro* können Fluorchinolone durch Abschwächung der Zytokinantwort Einfluss auf die zelluläre und humorale Immunantwort nehmen (Dalhoff & Shalit 2003). Der Anstieg Gram-negativer Bakterien und die Abmilderung der *T. gondii*-induzierten Ileitis vermutlich durch die Absenkung der Gram-negativen Bakterienlast, liess einen starken Einfluss dieser Bakteriengruppen auf die Darmentzündung erkennen. Um den Beitrag einzelner Bakterienspezies im Detail zu untersuchen, war es notwendig, zunächst gnotobiotische Tiere ohne nachweisbare kultivierbare Flora zu generieren. Durch definierte Rekolonisierung mit *E. coli*, *Bacteroides/Prevotella* spp. *Lactobacillus* sp. oder SPF-Flora aus gesunden bzw. an Ileitis erkrankten Tieren, konnte das inflammatorische Potenzial der einzelnen Bakterienspezies darstellbar gemacht werden (3.1.5). Die sehr geringe Histopathologie nach *T. gondii*-Infektion bei nichtbesiedelten, gnotobiotischen Tieren zeigte klar, dass die Induktion einer Immunantwort bei der *T. gondii*-induzierten Ileitis von der Anwesenheit von Bakterien abhängig war (Abb.17B). Eine Ileitis konnte im *T. gondii*-Modell nur ausgelöst werden, wenn eine *T. gondii*-Infektion von suszeptiblen Mäusen UND eine Besiedelung mit Bakterien erfolgte. So war z.B. bei gnotobiotischen C57BL/6-Wildtyp-Tieren ohne Rekolonisierung mit Bakterien, keine Ileitis nachweisbar (Abb.17B). Nach Monokolonisierung gnotobiotischer Mäuse mit *E. coli* bzw. Rekolonisierung mit *Bacteroides/Prevotella* spp. wurde zwar bei beiden Gruppen eine nur moderate Histopathologie beobachtet, aber die *E. coli*-monokolonisierten Tiere überlebten nicht nach Tag 13 p.i. (Abb.17A/B), während 22% der mit *Bacteroides/Prevotella* spp. rekolonisierten Mäuse bis Tag 22 p.i. überleben konnten. Dies zeigte, dass das inflammatorische Potenzial einzelner Arten unterschiedlich war, wobei *E. coli* und

Bacteroides/Prevotella spp. scheinbar additiv die Darmentzündung verstärken können (Abb.17B). Interessanterweise wurde ein unterschiedlich inflammatorisches Potenzial Gram-negativer Bakterien auch in anderen Untersuchungen beobachtet. In einer Studie mit gnotobiotischen IL-2^{-/-} Mäusen wurde nach Monokolonisierung mit *E. coli* mpk, nicht aber nach Kolonisierung mit *B. vulgatus* mpk oder *E. coli* Nissle 1917, eine Colitis ausgelöst (Waidmann *et al.* 2003). Mittels Genexpressionanalyse konnte festgestellt werden, dass bestimmte mutmasslich antiinflammatorische Gene bei der Kolonisierung mit *E. coli* mpk vermindert, bei Kolonisierung mit *E. coli* Nissle oder *B. vulgatus* aber verstärkt exprimiert wurden (Bohn *et al.* 2006). Es wurde eine hohe IL-6 Expression in diesem Modell beschrieben, wenn die Tiere mit dem nicht-colitogenem Stamm *B. vulgatus* mpk besiedelt waren, was möglicherweise als ein protektiver Faktor gegen die Auslösung der *E. coli* mpk vermittelten Colitis anzusehen ist (Frick *et al.* 2006). Ein individuelles inflammatorisches Potenzial von Bakterienspezies wurde auch in einem spontanen Colitis-Modell mit IL-10-defizienten Mäusen beobachtet. Die Monoassoziation der kommensalen Spezies, *Enterococcus faecalis* bzw. *E. coli*, führte zu voneinander verschiedenen Entzündungsverläufen (Kim *et al.* 2005). Das gering ausgeprägte inflammatorische Potenzial der Laktobazillen im Rahmen der *T. gondii*-induzierten Ileitis (Abb.17B-D) steht im Einklang mit ähnlichen Beobachtungen bei experimenteller Colitis (Waidmann *et al.* 2003; Dieleman *et al.* 2003; Sartor 2005) und der GvHD beim Menschen (Gerbitz *et al.* 2004). Der genaue Mechanismus durch den Darmbakterien eine Ileitis auslösen, ist durch die o.a. Ergebnisse der vorliegenden Arbeit noch nicht voll erklärbar, wenngleich eine entzündungsauslösende und/oder -verstärkende Interaktion von Komponenten Gram-negativer Bakterien mit Epithel- bzw. Immunzellen naheliegt. Die Verdrängung einer durch Gram-positive Bakterien dominierten gegen eine Gram-negative Flora im entzündeten Ileum unterstützt dabei die Hypothese, dass spezifische bakterielle Antigene Gram-negativer Bakterien wie z.B. das Lipopolysaccharid (LPS) zum Entzündungsprozeß beitragen könnten (siehe dazu 4.3). Zusammengefasst unterstützen die Daten der vorliegenden Arbeit, die auch durch die Arbeiten anderer Autoren (Mordue *et al.* 2001; Liesenfeld 2002; Robben *et al.* 2004; Buzoni-Gatel & Werts 2006, Abb.29) formulierte Hypothese: *T. gondii* verursacht durch das Eindringen in Enterozyten und Makrophagen, eine lokale Immunantwort, die durch zytotoxische Effekte und der Sekretion inflammatorischer Zytokine zu einem Zusammenbruch der Barrierefunktion und der Physiologie des Darmepithels führt. Die darauffolgende Akkumulation von Gram-negativen Bakterien im Ileum und bakterielle Translokation verstärkt dann die Entzündung durch weitere Induktion von Zytokinen des Th1-Typs, wie z.B. IFN-gamma und IL-12, proinflammatorischer Entzündungsmediatoren wie NO und die Rekrutierung von Immunzellen an den Entzündungsort.

4.2 Die spezielle Bedeutung von Toll-Like Rezeptoren bei beiden Darmentzündungsmodellen

Da durch die Rekolonisierungsexperimente gnotobiotischer Mäuse der Beitrag der Gram-negativen Flora, insbesondere von *E. coli* und *Bacteroides/Prevotella* spp. zur *T. gondii*-Ileitis erkennbar war (3.1.5), sollten die Mechanismen der Entzündungsverstärkung genauer untersucht werden. Die Hypothese, dass eine entzündungsverstärkende LPS/TLR4-Signaltransduktion an der Ausprägung der Immunpathologie beteiligt sein könnte, wurde analog durch Florenanalysen, Vergleich der Überlebensraten, der Bestimmung der Histopathologie und Immunmediatoren, sowie der RNA-Expression im Ileum bei C57BL/10 Wildtyp und TLR2-, TLR4-, bzw. TLR2+4-defizienten Tieren mit *T. gondii*-induzierter Ileitis untersucht. Gnotobiotische TLR4-defiziente Tiere mit definierter Rekolonisierung wurden eingesetzt, um das inflammatorische Potenzial einer *E. coli*-Monobesiedelung und von *E. coli* Lipid A auf die *T. gondii*-Ileitis zu untersuchen (siehe 3.2). Die umfangreiche kulturelle Florenanalyse, gestützt durch molekulare Methoden (Abb.18) ergab, dass bei allen Gruppen, Wildtyp und TLR-defizienten Tieren, ein signifikanter Anstieg von *E. coli* während der Entzündung stattfand. Der Anteil Gram-positiver Stäbchen, wie Laktobazillen und Clostridien, war bei allen Gruppen während der Entzündung geringgradig erniedrigt, während die Enterokokken und *Bacteroides/Prevotella* spp. geringgradig erhöht waren (Abb.18A). TLR4- bzw. TLR2+4-defiziente Mäuse zeigten nach *T. gondii*-Infektion eine verringerte Mortalität und Immunpathologie im Verlauf der Ileitis im Vergleich zu TLR2^{-/-} und Wildtyp-Tieren (Abb.19A/B). Die Werte für IFN-gamma und NO waren bei den TLR4-defizienten Tieren signifikant reduziert (Abb.20A/B). Eine möglicherweise ungleiche Parasitenlast zur Erklärung dieser Unterschiede, konnte durch den Nachweis, dass sich in allen Experimentalgruppen (Wildtyp und TLR-defiziente Tiere) eine nahezu identische Anzahl von Tachyzoiten im terminalen Ileum fand, widerlegt werden (Daten hier nicht gezeigt; Heimesaat, Fischer *et al.* 2007). Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigten, dass die Ileitis im *T. gondii*-Infektionsmodell über den TLR4-Signalweg verstärkt wurde. Dies unterstreicht die Rolle des LPS Gram-negativer Bakterien für die Auslösung und Verstärkung von Darmentzündungen im allgemeinen und wird auch durch die Behandlung gnotobiotischer Tiere mit gereinigtem LPS bekräftigt, was einen ähnlichen Entzündungsgrad auslösen konnte wie eine *E. coli*-Monobesiedelung gnotobiotischer Tiere. Ein *E. coli*-Isolat aus dem entzündeten Maudarm war in der Lage, eine ausgeprägte TLR4-abhängige Immunantwort *in vivo* und *in vitro* auszulösen (Abb.21B+C und Heimesaat, Fischer *et al.* 2007). Genotypisierungen von *E. coli*-Isolaten mittels RAPD-PCR aus gesundem und entzündetem Ileum (3.1.3.3.1) deuteten daraufhin, dass ein während der Ileitis akkumulierender *E. coli*-Stamm hochwahrscheinlich aus der gesunden Normalflora entstammte, wo er in nur geringer Zahl nachweisbar war (Abb.18A). Daten zu adhärennten invasiven *E. coli* (AIEC) Stämmen zeigen, dass diese in Makrophagen

eindringen, dort überleben und eine starke TNF-alpha Antwort hervorrufen können (Boudeau *et al.* 1999; Glasser *et al.* 2001; Bringer *et al.* 2006; Barnich & Darfeuille-Michaud 2007). Interessante probiotische Therapieansätze gegen adhären-invasive *E. coli* belegen die mögliche Bedeutung solcher Strategien bei der CED im Menschen (Boudeau *et al.* 2003; Ingrassia *et al.* 2005). Einige in der vorliegenden Arbeit isolierten *E. coli*-Stämme blieben zwar ohne Nachweis für einige bekannte Pathogenitätsfaktoren (Shiga-Toxin *stx1/2*, Intimin *eaeA*, alpha-Hämolysin *hlyA*, Serinprotease *espA*, Katalase/Peroxidase *katP*, hitze-stabiles Enterotoxin *astA*), wurden aber nicht auf eine mögliche enteroinvasive Kompetenz hin untersucht (3.1.3.3.2). *In vitro* Daten (hier nicht gezeigt) konnten im übrigen zeigen, dass die *E. coli*-induzierte NO-Ausschüttung aus murinen Peritonealmakrophagen durch ein hitze-inaktiviertes Lysat von *Lactobacillus johnsonii* reduziert werden konnte, was schliessen lässt, dass der dominierende Anteil an Laktobazillen der gesunden Flora möglicherweise eine durch *E. coli* verursachte Immunreaktion verhindern kann (Heimesaat, Fischer *et al.* 2007). Die Tatsache, dass am Tag acht/neun p.i. beim Wildtyp und TLR4-defizienten Mäusen lebende *E. coli* in mesenterialen Lymphknoten, Milz und Leber vergleichbar häufig nachgewiesen werden konnten (Daten hier nicht gezeigt; Heimesaat, Fischer *et al.* 2007), deutete an, dass weder TLR2, noch TLR4 die Translokation von Bakterien vermitteln, was in Folge zu einem direkten Kontakt von *E. coli*-Zellwandbestandteilen mit Immunzellen führen kann. Erniedrigte IFN-gamma und NO-Werte im entzündeten Ileum TLR4-defizienter Mäuse im Vergleich zum Wildtyp und TLR2^{-/-} (Abb.20), unterstützen die Hypothese, dass translozierende *E. coli* die intestinale Entzündungsreaktion über einen LPS-vermittelten Signalweg verstärken. In der Folge werden Entzündungsmediatoren aus Makrophagen und Granulozyten ausgeschüttet, welche die Gewebeerstörung verstärken und die ihrerseits eine sekundäre Immunantwort durch T-Zellen auslösen. Um die Hypothese des TLR4/LPS-vermittelten Mechanismus zur Auslösung der Entzündung noch weiter zu stützen, wurden C57BL/6-Mäuse mit *T. gondii*-Ileitis, die mit dem nicht-resorbierbaren LPS-Antagonisten Polymyxin B (Warren *et al.* 1985; Tsubery *et al.* 2000, 2000a, 2002; 2005) behandelt. Die in der vorliegenden Arbeit mit Polymyxin B behandelten Tiere wiesen eine abgemilderte Histopathologie (Abb.22A) und erniedrigte NO-Werte (Abb.22C) auf, im Vergleich zu Placebo-behandelten Kontrolltieren, wobei eine prophylaktische Gabe des Polymyxin B effektiver war, als eine therapeutische Behandlung. Zudem war die Darmlänge bei prophylaktisch mit Polymyxin B behandelten Tieren signifikant weniger verkürzt als bei der Placebo-Kontrolle (Abb.22B). Eine Analyse der Flora zeigte, dass *E. coli* bei Polymyxin B behandelten Tieren selektiv eradiziert wurde (Heimesaat, Fischer *et al.* 2007). Die lässt auf eine mögliche zweiseitige Wirkung des Polymyxin B schliessen, eine antibiotische Wirkung und die Bindung von LPS. Neben einer antibiotischen Modulation der Darmflora über Antibiotika könnte somit auch eine Blockade des LPS-vermittelten Signalweges zu neuen Wegen in der Behandlung der Ileitis führen. So ist bereits eine Reihe von Substanzen bekannt, die z.B. als LPS-Antagonisten LPS-

induzierbare Zytokinproduktion inhibieren können Untersuchungen zum Wirkmechanismus von Polymyxin B belegen, dass Polymyxin B die LPS-induzierte Bildung von Zytokinen bei Monozyten aus peripherem Blut effektiv blockieren kann (Tsuzuki *et al.* 2001). Polymyxin B ist allerdings beim Menschen aufgrund toxischer Nebenwirkungen nicht systemisch anwendbar, weshalb chemische Abwandlungen des Grundgerüsts auf ihre Wirksamkeit und möglichen systemischen Einsatz beim Menschen untersucht werden (David 2001). Eine Senkung der Toxizität bei z.T. verbesserter Wirkung beschreiben z.B. Tsubery *et al.* (2005). Chemisch modifizierte Konjugate des Polymyxin B waren demnach bis zu zehnmal weniger toxisch und konnten die Überlebensrate von Mäusen, die eine normalerweise letale *Klebsiella*-Infektion erhalten hatten, verbessern (Tsubery *et al.* 2005). In einer *ex vivo* Laborstudie konnte nachgewiesen werden, dass Eritoran (E5564) die LPS-induzierte Bildung von proinflammatorischen Zytokinen wie IL-6 und TNF-alpha in humanen Monozyten blockieren kann (Czeslick *et al.* 2006). *In vitro* kann z.B. eine LPS-vermittelte Aktivierung der TNF-alpha Ausschüttung aus Mausmakrophagen durch Eritoran inhibiert werden, sowie *in vivo* die LPS-induzierte Ausschüttung von Zytokinen blockiert bzw. eine erhöhte Letalität bei Mäusen nach Behandlung mit *E. coli* gesenkt werden (Mullarkey *et al.* 2003). Eritoran wurde am Menschen bereits auch auf seine Fähigkeit hin überprüft, einen Endotoxinschock zu verhindern (Rossignol *et al.* 2004). Ein weiterer potentieller Kandidat zum Einsatz gegen einen Endotoxinschock beim Menschen ist ein kürzlich entdecktes Produkt (Cyp) aus dem Cyanobakterium *Oscillatoria planktothrix* FP1. Cyp hat sich als ein effektiver kompetitiver Inhibitor von LPS *in vitro* und im *in vivo*-Mausmodell herausgestellt (Macagno *et al.* 2006). Das Lipid A-Mimetikum CRX-526 besitzt eine antagonistische TLR4-Aktivität und kann die Interaktion von LPS mit dem Immunsystem blockieren. Bei einem DSS-Colitis-Modell und spontaner Colitis bei MDR1a-defizienten Mäusen (engl.: multidrug resistance gene 1a) konnte mit CRX-526 eine Verminderung der gastrointestinalen Entzündung herbeigeführt werden (Fort *et al.* 2005). In der vorliegenden Arbeit wurde die Ausprägung der *T. gondii*-induzierten Ileitis bei TLR2-, TLR4- bzw. TLR2+4-defizienten Tieren untersucht. Dabei wurde besonders die Wechselwirkung kommensaler Darmbakterien und einzelner Bakterienspezies bei TLR4-defizienten Tieren beschrieben. Es sind neben TLR4 noch andere TLRs und Adaptermoleküle bzw. TLR-Liganden bekannt, die im Rahmen einer *T. gondii*-Infektion an der Ausprägung der Immunpathologie beteiligt sein können (Scanga *et al.* 2002; Mun *et al.* 2003, 2005; Yarovsky *et al.* 2005; Bennouna *et al.* 2006; Minns *et al.* 2006; Yarovsky & Sher 2006; Khan *et al.* 2007). Die Widerstandsfähigkeit des Wirtes gegen eine *T. gondii*-Infektion und die *T. gondii*-infektionsbedingte Bildung von IL-12 sind von dem Adaptermolekül MyD88 abhängig. Bei MyD88-defizienten Tieren konnten sich die Parasiten unkontrolliert vermehren, während bei TLR2- bzw. TLR4-defizienten Tieren eine normale IL-12 Antwort von DCs auf STAg (lösliches Tachyzoiten-Antigen) zu beobachten war (Scanga *et al.* 2002). Die Auslösung einer inflammatorischen Antwort nach oraler *T. gondii*-Infektion scheint von TLR9 abhängig zu sein, da die Expansion von DCs in

mesenterialen Lymphknoten infizierter Mäuse von einer TLR9-Expression abhängig ist. Die angeborene Immunantwort auf die orale *T. gondii*-Infektion wird somit u.a. über TLR9 vermittelt (Minns *et al.* 2006). Weiterhin ist ein möglicher Einfluss einer *T. gondii*-Infektion auf den LPS/TLR4-Signalweg beschrieben, da auf der Oberfläche von *T. gondii*-infizierten murinen peritonealen neutrophilen Granulozyten nach LPS-Induktion die Mobilisierung von TNF-alpha abgeschwächt ist, was auf einen möglichen immunsuppressiven Effekt von *T. gondii* hinweisen könnte (Bennouna *et al.* 2006). Eine Signalweiterleitung über ein Profilin-artiges Molekül aus *T. gondii* als Ligand für TLR11 und eine nachfolgende deutliche Ausschüttung von proinflammatorischen IL-12 aus DCs ist im murinen Modell beschrieben (Yarovinsky *et al.* 2005, Yarovinsky & Sher 2006). Beim Menschen ist TLR11 allerdings nicht funktional wegen des Vorhandenseins eines Stop-Codons im entsprechenden Gen (Zhang *et al.* 2004). Möglicherweise führt dieser TLR11-vermittelte Signalweg, der in der Folge höchswahrscheinlich durch die Auswirkungen der TLR4-LPS Signalinduktion überdeckt wird, zu einem initialen lokalen Epithelschaden in Ergänzung zu den o.a. Auswirkungen einer *T. gondii*-Infektion auf die Enterozyten (Abb.29). Die o.a. Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zum Beitrag Gram-negativer Bakterien zur *T. gondii*-induzierten Dünndarmentzündung decken sich mit Beobachtungen bei experimentellen Colitismodellen. Hierbei ist bekannt, dass eine ausgeprägte Colitis mit einer erhöhten Enterobakterien-Last einhergeht, und dass Mäuse, die auf LPS kaum reagieren, eine weniger ausgeprägte Colitis entwickeln (Lange *et al.* 1996). Es konnte bei einem DSS-Colitis-Modell mit TLR9-defizienten Mäusen gezeigt werden, dass die DNA kommensaler Bakterien eine chronische Dickdarmentzündung verstärkt (Obermeier *et al.* 2005). Weiterhin soll eine experimentelle Dickdarmentzündung durch TLR4-Antagonisten und präbiotisch wirkenden bakteriellen Substanzen erfolgreich unterdrückt werden können (Fort *et al.* 2005; Okada *et al.* 2006). Jedoch wird in den verschiedenen Colitis-Modellen die Rolle bakterieller Komponenten und angeborener Immunität bei der Auslösung einer Entzündung kontrovers diskutiert, da sich z.B. bei Ohkawara *et al.* (2005) zwischen kranken TLR4-defizienten und Wildtypmäusen weder klinische Parameter noch histopathologische Veränderungen unterschieden. Im Gegensatz zu den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit, dass bei Tieren mit einer TLR(4)-Defizienz der Schweregrad von *T. gondii*-Ileitis bzw. DSS-Colitis verringert war, haben andere Untersucher (Rakoff-Nahoum *et al.* 2004; Araki *et al.* 2005) gezeigt, dass MyD88^{-/-} bzw. TLR4- oder TLR2-defiziente Tiere eine stärker ausgeprägte Colitis entwickelten als die Wildtypen. Dies wird damit erklärt, dass die Wechselwirkung von TLRs mit kommensalen Antigenen den Differenzierungsgrad von intestinalen Epithelzellen und damit die intestinale Homöostase aufrecht erhält, was zum Schutz gegen toxische Substanzen wie z.B. dem DSS wichtig sein könnte (Rakoff-Nahoum *et al.* 2004). Zusammengefasst zeigt die vorliegende Arbeit, dass intestinale Entzündung erheblich von der Zusammensetzung der Darmflora abhängt, und insbesondere Gram-negative Bakterien zum ilealen Entzündungsprozess beitragen. Dies unterstützt bereits

vorhandene Strategien zur Behandlung der CED durch Modulation der Flora über Antibiotika oder Probiotika, sowie den möglichen Einsatz von LPS-blockierenden Substanzen. Die Verstärkung der Ileitis durch ein Überwuchern mit *E. coli* macht die Notwendigkeit einer detaillierten Analyse der Darmflora deutlich, um den Beitrag individueller bakterieller Gruppen oder Spezies zum Krankheitsgeschehen einzuordnen.

4.3 Die DSS-Colitis als Darmentzündungsmodell

Die umfangreiche Florenanalyse der Colonflora konnte in der vorliegenden Arbeit zeigen, dass nach siebentägiger Behandlung mit DSS am Tag acht ein signifikanter Anstieg von *E. coli* bei C57BL/10-Wildtyp Tieren, aber nicht bei TLR-defizienten Tieren nachweisbar war. Bei anderen Bakteriengruppen wie Laktobazillen und Clostridien, bzw. Enterokokken und *Bacteroides/Prevotella* spp. waren keine signifikanten entzündungsbedingten Veränderungen zu erkennen (Abb.23). Eine hohe *E. coli*-Last war dabei offenbar mit einer klinischen Verschlechterung beim Wildtyp im Vergleich zu den TLR-defizienten Tieren assoziiert (Abb.24A). Durch die Kombination einer umfangreichen Florenanalyse, der Aufnahme klinischer Parameter, sowie der Bestimmung von IFN-gamma in Organkulturüberständen ergänzt durch eine Charakterisierung der Florenmuster mittels PCR-DGGE, konnte hier gezeigt werden, dass die DSS-induzierte Colitis reproduzierbar durch einen deutlichen Verlust der bakteriellen Diversität gekennzeichnet war. Sie ging mit einem Anstieg der kommensalen Gram-negativen Bakterien, die als *E. coli* identifiziert werden konnten, einher. Wie bereits oben beschrieben, wird eine Überwucherung der Darmflora mit Enterobakterien bei verschiedenen Erkrankungen beobachtet (Husebye 2005) und geht vermutlich auf einen Zusammenbruch der mukosalen Physiologie und damit der Barrierefunktion zurück. Dies wird auch weitgehend durch die Ergebnisse dieser Arbeit zur *T. gondii*-Ileitis unterstützt. Die bei Entzündung vorherrschenden *E. coli* sind demnach assoziiert mit Entzündung im Colon von IL-2^{-/-} Mäusen (Schuppler *et al.* 2004). Die Akkumulation von Enterobakterien im entzündeten Colon DSS-behandelter Mäuse konnte zusätzlich zur kulturellen Analyse mittels DGGE in der vorliegenden Arbeit bestätigt werden. Zusätzlich zu den akkumulierenden *E. coli* wurden mittels DGGE bisher nicht-kultivierbare *Lactobacillus*- bzw. *Clostridium*-Arten detektiert, die im Verlauf der Entzündung zurückgingen bzw. anstiegen (Abb.25A/B). Die DGGE wurde bereits bei der Identifizierung von Florenveränderungen im Rahmen von spontanen Colitismodellen mit HLA/B27-transgenen Ratten (Hoentjen *et al.* 2005) und IL-10 defizienten Mäusen (Bibiloni *et al.* 2005b), aber auch bei der Charakterisierung von bakterien-assoziiierter CED im Menschen (Bibiloni *et al.* 2006) angewendet. Der wichtige Beitrag der Colonflora zur Ausprägung einer Colitis konnte durch Abmilderung der Entzündung nach antibiotischer Behandlung gezeigt werden (Hans *et al.* 2000a, Rath *et al.* 2001). Das entzündliche Potential individueller Bakterienspezies kann dabei sehr variabel sein (siehe dazu 4.1.2). Dem colitogenen Potential von *E. coli* nach Rekonstitution mit einem *E. coli*-Isolat bei keimfreien IL2-defizienten Mäusen, steht der protektive Effekt von *B. vulgatus* mpk gegenüber, der die Auslösung einer *E. coli*-bedingten Colitis verhindern kann. Der Stamm *E. coli* Nissle 1917 konnte dagegen keine Colitis induzieren (Waidmann *et al.* 2003). Dies wird auch gestützt durch die Beobachtung, dass eine Behandlung mit *E. coli* Nissle 1917 eine DSS-Colitis abschwächen kann (Schultz *et al.* 2004) und der protektive Effekt dieses *E. coli* Stammes TLR2 und

TLR4 abhängig zu sein scheint (Grabig *et al.* 2006). Dies deutet auch an, dass das entzündliche Potential von *E. coli* stammabhängig ist. Definierte Mechanismen, durch die akkumulierende *E. coli* die Colitis verschlimmern, sind bisher nicht bekannt. Dass bei TLR2-, TLR4-, TLR2+4-defizienten Tieren die Colitis weniger ausgeprägt war, wie in den Untersuchungen der vorliegenden Arbeit beobachtet, belegt die wichtige Funktion von LPS und TLR2-Liganden, wie Peptidoglykan und Lipoprotein für die Auslösung und Ausprägung der Colitis. Bekräftigt wird dies auch durch die erniedrigten IFN-gamma in Organkulturüberständen aus MLN von TLR-defizienten Tieren (Abb. 24B). Voruntersuchungen zur Colitis bei LBP-defizienten Mäusen hatten gezeigt, dass auch bei Balb/c-Wildtypen im Vergleich zu den LBP^{-/-}-Tieren ein signifikanter Anstieg der *E. coli*-Last im Verlauf der Entzündung zu beobachten war (Heimesaat, Fischer *et al.* 2007b, PloS ONE). Den LBP^{-/-} Mäusen ging es dabei klinisch signifikant besser, als den Wildtypen. Diese Daten wiesen darauf hin, dass der Anstieg von *E. coli* nicht vom genetischen Hintergrund der Tiere abhängig war, sondern als ein genereller entzündungsbedingter Effekt zu werten ist. In der vorliegenden Arbeit wurden detaillierte histologische Analysen der Colonepithelarchitektur in DSS-behandelten Tieren durchgeführt. Der Gewebeschaden wurde doppel-blind nach einem international evaluierten standardisierten Punktesystem bewertet. Demnach waren die Gewebeschäden im Colon sehr ähnlich bei Wildtyp und TLR2-, TLR4- bzw. TLR2+4-Tieren (Daten hier nicht gezeigt, Heimesaat, Fischer *et al.* 2007b, PloS ONE). In den hier durchgeführten Untersuchungen konnte somit histopathologisch kein TLR-bedingter protektiver Effekt auf die DSS-Colitis nachgewiesen werden. Dies steht im Gegensatz zu den Daten anderer Untersucher, dass der bei TLR-defizienten Tieren beobachtete DSS-bedingte Epithelschaden vermutlich auf eine defekte Gewebeproliferation und Wundheilfunktionen zurückzuführen ist (Rakoff-Nahoum *et al.* 2004, Araki *et al.* 2005). Die abweichenden Ergebnisse könnten aber auch mit den unterschiedlichen genetischen Hintergründen der Tiere in beiden Arbeitsgruppen zusammenhängen. Eine mögliche TLR5-Flagellin Signaltransduktion könnte bei der Auslösung der Entzündungsantwort im Colon bei der vorliegenden Arbeit ebenfalls beteiligt sein. In einem C3H/HeJ-Bir Colitismodell wurde eine spezielle Form des Flagellins aus kommensalen *Clostridium* spp. als dominantes Antigen identifiziert (Lodes *et al.* 2004). Interessanterweise sind ca. 50% der M. Crohn- aber nicht Colitis ulcerosa-Patienten seropositiv für genau diesen Flagellintyp (Targan *et al.* 2005). Im DSS-Colitis Modell der vorliegenden Arbeit trat eine der Clostridien-Gruppe zuzuordnende Bande bei der DGGE-Analyse von Wildtyp-Tieren mit Colitis deutlich hervor (Abb.26A), was auf einen möglichen Zusammenhang hinweisen könnte. Eine Identifizierung von Clostridien-Flagellin und ein eindeutiger Nachweis, dass dies im vorliegenden DSS-Modell, im Vergleich zum klar erwiesenen TLR4-LPS Effekt, eine entzündungsfördernde Rolle spielt, wurde allerdings hier nicht näher untersucht. Zusammengefasst, unterstützt die vorliegende Arbeit die Ansicht, dass eine DSS-Behandlung einen Zusammenbruch der mukosalen Physiologie nach sich zieht, was eine Akkumulation von *E. coli* im entzündeten

Colon zur Folge hat. Die Tatsache, dass ähnliche Prozesse bei humaner CED beobachtet werden können, hebt die DSS-Colitis als geeignetes Modell zum Studium der Wechselwirkungen der kommensalen Darmflora und dem Darmepithel bzw. mit Immunzellen des Darms hervor. In diesem Modell kann die Funktion von Darmbakterien beim Entzündungsgeschehen, der Beitrag bakterieller Komponenten zur Entzündung und die Potenz neuer therapeutischer Ansätze untersucht werden, die auf die Modulation der Flora durch Antibiotika oder Probiotika abheben.

4.4 Der Einfluss einer Salmonella-Lebendvakzine auf *H. pylori*-induzierte Änderungen der Mausemaginaflora

Eine *H. pylori*-Infektion beim Menschen kann gastrointestinale Beschwerden hervorrufen und im Verlauf einer chronischen Infektion die Entstehung von MALT-Lymphomen und Magen-Karzinomen begünstigen (siehe Einleitung 1.4). Da eine Kombinationstherapie mit Antibiotika und Protonenpumpeninhibitoren teuer (Rupnow *et al.* 1999, 2001) und von der Mitwirkung des Patienten abhängig ist, gibt es Bestrebungen, eine einfach zu verabreichende, wirksame orale Einmalimpfung z.B. in Form einer attenuierten *Salmonella*-Lebendvakzine gegen *H. pylori* zu entwickeln (Aebischer *et al.* 2005). Es wurden bereits präklinische Studien im Tiermodell basierend auf der *Helicobacter*-Urease als Antigen (Ferrero *et al.* 1995; Michetti *et al.* 1994; Gomez-Duarte *et al.* 1998) und klinische Studien am Menschen durchgeführt (Kreiss *et al.* 1996; Michetti *et al.* 1999; Angelakopoulos & Hohmann 2000; DiPetrillo *et al.* 1999; Bumann *et al.* 2001; Metzger *et al.* 2004). Der Schwerpunkt der vorliegenden Arbeit lag auf der molekularen Analyse der Florenveränderung, die nach einer *H. pylori*-Infektion bzw. nach Immunisierung mit einer *Salmonella*-Lebendvakzine und anschließender *H. pylori*-Infektion im Magen der Maus stattfand. Dabei soll insbesondere der möglicherweise pathologische Effekt dieser Florenverschiebung diskutiert werden. Es konnte in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, dass eine *H. pylori*-Infektion von einem Anstieg der bakteriellen Diversität in der Magenflora begleitet war. Die Ergebnisse der 16S rRNA-Klonbibliotheksanalysen (Abb.27/28) zeigten, dass der Anteil residenter Laktobazillen der gesunden Magenflora nach *H. pylori*-Infektion gesenkt wurde, während der Anteil anderer Bakterienspezies anstieg. Dieser Anteil bestand neben Laktobazillen und *H. pylori* aus Arten der *Clostridium coccoides* Gruppe, *Clostridium* spp., *Bacteroides/Prevotella* spp., *Eubacterium* spp., *Ruminococcus* spp., *E. coli*, *Streptococcus* spp., *Lactococcus* spp. und taxonomisch zuzuordnenden Vertretern aus dem *Cytophaga-Flavobacter-Bacteroides* Phylum (Tab.17). Der *H. pylori*-infektionsbedingte Anstieg der Diversität konnte durch eine prophylaktische Immunisierung mit der *Salmonella*-Lebendvakzine (siehe 2.3.3) verhindert werden. Der Anteil der Laktobazillen im Magen der immunisierten Gruppe entsprach dem der nicht *H. pylori*-infizierten Tieren (Abb.28). Der Anteil von residenten Laktobazillen der Magenflora als mögliches Kolonisierungshindernis für *H. pylori* und die Anwendung molekularer Methoden zur Charakterisierung der Magenflora wurde z.B. bei Gerbilen beschrieben (Sun *et al.* 2003, 2005; Monstein *et al.* 2000). Beim Menschen wurde ein signifikanter Anstieg der Bakterienlast im Magen nach *H. pylori*-Infektion und Behandlung mit dem Protonenpumpeninhibitor Omeprazol beobachtet (Mowat *et al.* 2000). Die erhöhte Anzahl an Bakterien korrelierte mit erhöhten Nitrit und erniedrigten Vitamin C Werten im Magensaft, was möglicherweise dazu führt, dass nitrifizierende Bakterien aufgrund hoher Nitritwerte für den Menschen karzinogene Nitrosamine (NOC, engl.: N-nitroso compounds) produzieren können. Unter physiologischen Bedingungen kann bei einem

niedrigen pH-Wert im Magen, Nitrit mit Hilfe von Vitamin C zu Nitritoxid umgewandelt werden (Williams 2001, Mowat *et al.* 2000; Mowat & McColl 2001). Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit belegen, dass eine *H. pylori*-Infektion grundlegende Änderungen der Magenflora bei Mäusen induziert. Dies führt möglicherweise zur Entstehung neuer Nischen für Bakterienarten, die sich normalerweise nur transient im Magen befinden. Dass Bakterien, die natürlicherweise in distaleren Darmabschnitten lokalisiert sind, den Magen von *H. pylori*-infizierten Mäusen kolonisieren können, deutet an, dass sich diese kommensalen Darmbakterien nach *H. pylori*-Infektion an veränderte physiologische Bedingungen im Magen anpassen können (Salzman *et al.* 2002). Daher könnten in *H. pylori*-infizierten Mäusen, neben *H. pylori* selbst, auch andere Bakterien aus distaleren Darmabschnitten zur Pathologie beitragen, da z.B. Laktobazillen, die Nitrat nicht zu Nitrit umwandeln können, durch nitrifizierende Bakterien wie z.B. Clostridien verdrängt werden. Zusätzlich zu *H. pylori* besitzen auch andere Spezies inflammatorisches Potential wie z.B. bei der *Acinetobacter Iwoffii*-induzierten Gastritis im Mausmodell (Zavros *et al.* 2002a). Ein erhöhter Magen-pH ist offenbar mit Entzündung korreliert (Feldmann *et al.* 1996, El Omar *et al.* 1997, Zavros *et al.* 2002b). Verminderte Magensäureproduktion oder Gewebeschäden induziert durch *H. pylori*-Infektion könnten als Erklärung für eine erhöhte bakterielle Diversität dienen. Beide Parameter, Magen-pH bzw. Gewebeschaden, konnten in der vorliegenden Arbeit aber nicht als Erklärung der Florenverschiebung nach *H. pylori*-Infektion dienen. Bei *H. pylori*-infizierten Tieren war keine erkennbare Histopathologie der Magenschleimhaut nachzuweisen und die pH-Messungen des Magens ergaben, dass sich die Werte bei *H. pylori*-infizierten Tieren im Vergleich zu immunisierten bzw. PBS-behandelten Mäusen nicht signifikant unterschieden (Aebischer *et al.* 2006, Daten hier nicht gezeigt). Obwohl die Gründe für die *H. pylori*-induzierte Diversitätserhöhung der Magenflora unklar bleiben, unterstützt *H. pylori* vermutlich die Wachstumsbedingungen für Darmbakterien durch die Produktion von Ammonium und Bikarbonat aus Harnstoff. Beide Substanzen könnten als Substrat für andere Bakterien dienen. Es ist weiterhin bekannt, dass Stress als Folge von Hunger den Anteil der Laktobazillen im Mausmagen verringert (Tannock & Savage 1974), wobei die *H. pylori*-Infektion auch als eine Art von „Stress“ gewertet werden kann. Der Nachweis kommensaler Darmbakterien im Magen von *H. pylori*-infizierten Tieren könnte neben dem Aufstieg von Bakterien aus distaleren Darmabschnitten auch mit dem koprophagen Verhalten der Tiere zusammenhängen. Die Gründe für den beobachteten Anstieg der bakteriellen Diversität im Magen nach *H. pylori*-Infektion bleiben damit also nicht vollständig geklärt. Zusammengefasst, begünstigt eine *H. pylori*-Infektion durch die o.g. Faktoren offenbar die Ausbildung neuer ökologischer Nischen für Bakterien, die im Magen physiologischerweise nicht vorkommen. Die Tatsache, dass durch die Immunisierung die *H. pylori*-Last gesenkt und der physiologische Anteil der Laktobazillen im Magen erhalten werden konnte, gibt einen Hinweis darauf, dass mit der Anwendung dieser Vakzine beim Menschen möglicherweise pathologische Schäden durch eine dauerhaft hohe *H. pylori*-

Last im Magen vermieden werden können. Dass viele 16S rRNA-Sequenzen mit Spezies korrespondierten, die als bisher unkultivierbar galten, rechtfertigt den molekulargenetischen Ansatz zur komplexen Analyse der Magenflora in der vorliegenden Arbeit. Da histopathologische Mukosaveränderungen des Magenepithels weitere Änderungen des Ökosystems induzieren könnten, wäre es lohnend, die Techniken zur Analyse der *H. pylori*-induzierten Änderungen der Magenflora in anderen Mausstämmen zu untersuchen, in denen sich stärkere Anzeichen einer Immunpathologie im Magen entwickeln (Sakagami *et al.* 1996).

Literaturverzeichnis

- Abbas AK, Murphy KM, Sher A (1996). Functional diversity of helper T lymphocytes. *Nature*;383(6603):787-93.
- Abreu MT, Vora P, Faure E, Thomas LS, Arnold ET, Arditi M (2001). Decreased expression of Toll-like receptor-4 and MD-2 correlates with intestinal epithelial cell protection against dysregulated proinflammatory gene expression in response to bacterial lipopolysaccharide. *J Immunol*;167(3):1609-16.
- Abreu MT, Fukata M, Arditi M (2005). TLR signaling in the gut in health and disease. *J Immunol*;174(8):4453-60.
- Aebischer T, Schmitt A, Walduck AK, Meyer TF (2005). *Helicobacter pylori* vaccine development: facing the challenge. *Int J Med Microbiol*;295(5):343-53.
- Aebischer T, **Fischer A**, Walduck A, Schlötelburg C, Lindig M, Schreiber S, Meyer TF, Bereswill S, Göbel UB (2006). Vaccination prevents *Helicobacter pylori*-induced alterations of the gastric flora in mice. *FEMS Immunol Med Microbiol*; 46(2):221-9.
- Ahmad R, Qureshi HY, El Mabrouk M, Sylvester J, Ahmad M, Zafarullah M (2006). Interferon gamma inhibits interleukin-1-induced MMP-13 expression in human articular chondrocytes via receptor-mediated STAT-1 activation and interaction with CBP/P300 coactivator. *Ann Rheum Dis*; (Epub ahead of print)
- Akira S, Takeda K, Kaisho T (2001). Toll-like receptors: critical proteins linking innate and acquired immunity. *Nature Immunol*;2:675-80.
- Altschul SF, Madden TL, Schäffer AA, Zhang J, Zhang Z, Miller W, Lipman DJ (1997). Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.*; 25:3389-3402.
- Amann RI, Ludwig W, Schleifer KH (1995). Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiol Rev*;59:143-169.
- Anceriz N, Vandal K, Tessier PA (2007). S100A9 mediates neutrophil adhesion to fibronectin through activation of beta2 integrins. *Biochem Biophys Res Commun*; (Epub ahead of print)
- Angelakopoulos H, Hohmann EL (2000). Pilot study of phoP/phoQ-deleted *Salmonella enterica* serovar typhimurium expressing *Helicobacter pylori* urease in adult volunteers. *Infect Immun*;68(4):2135-41.
- Araki A, Kanai T, Ishikura T, Makita S, Uraushihara K, Iiyama R, Totsuka T, Takeda K, Akira S, Watanabe M (2005). MyD88-deficient mice develop severe intestinal inflammation in dextran sodium sulfate colitis. *J Gastroenterol*;40(1):16-23.

- Axelsson LG, Landstrom E, Goldschmidt TJ, Gronberg A, Bylund-Fellenius AC (1996). Dextran sulfate sodium (DSS) induced experimental colitis in immunodeficient mice: effects in CD4(1)-cell depleted, athymic and NK-cell depleted SCID mice. *Inflamm Res*;45:181-191.
- Bamias G, Marini M, Moskaluk CA, Odashima M, Ross WG, Rivera-Nieves J, Cominelli F (2002). Down-regulation of intestinal lymphocyte activation and Th1 cytokine production by antibiotic therapy in a murine model of Crohn's disease. *J Immunol*;169:5308-14.
- Barnich N, Boudeau J, Claret L, Darfeuille-Michaud A. (2003). Regulatory and functional co-operation of flagella and type 1 pili in adhesive and invasive abilities of AIEC strain LF82 isolated from a patient with Crohn's disease. *Mol Microbiol* 48:781-794.
- Barnich N, Darfeuille-Michaud A (2007). Adherent-invasive *Escherichia coli* and Crohn's disease. *Curr Opin Gastroenterol*;23(1):16-20.
- Beelen DW, Elmaagacli A, Muller KD, Hirche H, Schaefer UW (1999). Influence of intestinal bacterial decontamination using metronidazole and ciprofloxacin or ciprofloxacin alone on the development of acute graft-versus-host disease after marrow transplantation in patients with hematologic malignancies: final results and long-term follow-up of an open-label prospective randomized trial. *Blood*;93:3267-75.
- Bennouna S, Sukhumavasi W, Denkers EY (2006). *Toxoplasma gondii* inhibits toll-like receptor 4 ligand-induced mobilization of intracellular tumor necrosis factor alpha to the surface of mouse peritoneal neutrophils. *Infect Immun*;74(7):4274-81.
- Bibiloni R, Fedorak RN, Tannock GW, Madsen KL, Gionchetti P, Campieri M, De Simone C, Sartor RB (2005a). VSL#3 probiotic-mixture induces remission in patients with active ulcerative colitis. *Am J Gastroenterol*;100(7):1539-46.
- Bibiloni R, Simon MA, Albright C, Sartor B, Tannock GW (2005b). Analysis of the large bowel microbiota of colitic mice using PCR/DGGE. *Lett Appl Microbiol*;41(1):45-51.
- Bibiloni R, Mangold M, Madsen KL, Fedorak RN, Tannock GW (2006). The bacteriology of biopsies differs between newly diagnosed, untreated, Crohn's disease and ulcerative colitis patients. *J Med Microbiol*;55(Pt 8):1141-9.
- Bik EM, Eckburg PB, Gill SR, Nelson KE, Purdom EA, Francois F, Perez-Perez G, Blaser MJ, Relman DA (2006). Molecular analysis of the bacterial microbiota in the human stomach. *Proc Natl Acad Sci*;103(3):732-7.
- Bodhidatta L, Hoge CW, Churnratanakul S, Nirdnoy W, Sampathanakul P, Tungtaem C, Raktham S, Smith CD, Echeverria P (1993). Diagnosis of *Helicobacter pylori* infection in a developing country: comparison of two ELISAs and a seroprevalence

- study. J Infect Dis 168;1549-1553.
- Bohn E, Bechtold O, Zahir N, Frick JS, Reimann J, Jilge B, Autenrieth IB (2006). Host gene expression in the colon of gnotobiotic interleukin-2-deficient mice colonized with commensal colitogenic or noncolitogenic bacterial strains: common patterns and bacteria strain specific signatures. Inflamm Bowel Dis;12(9):853-62.
- Boudeau J, Glasser AL, Masseret E, Joly B, Darfeuille-Michaud A (1999) Invasive ability of an *Escherichia coli* strain isolated from the ileal mucosa of a patient with Crohn's disease. Infect Immun 67:4499-4509.
- Boudeau J, Glasser AL, Julien S, Colombel JF, Darfeuille-Michaud A (2003). Inhibitory effect of probiotic *Escherichia coli* strain Nissle 1917 on adhesion to and invasion of intestinal epithelial cells by adherent-invasive *E. coli* strains isolated from patients with Crohn's disease. Aliment Pharmacol Ther;18(1):45-56.
- Boyle JS, Lew AM (1995). An inexpensive alternative to glassmilk for DNA purification. Trends Genet;11(1):8.
- Bringer MA, Glasser AL, Tung CH, Meresse S, Darfeuille-Michaud A (2006). The Crohn's disease-associated adherent-invasive *Escherichia coli* strain LF82 replicates in mature phagolysosomes within J774 macrophages. Cell Microbiol;8(3):471-84.
- Brown LM (2000). *Helicobacter pylori*: epidemiology and routes of transmission. Epidemiol Rev;22:283-97.
- Bull AT, Ward AC, Goodfellow M (2000). Search and discovery strategies for biotechnology: The paradigm shift. Microbiol Mol Biol Rev 64:573-606.
- Bumann D, Metzger WG, Mansouri E, Palme O, Wendland M, Hurwitz R, Haas G, Aebischer T, von Specht BU, Meyer TF (2001). Safety and immunogenicity of live recombinant *Salmonella enterica* serovar Typhi Ty21a expressing urease A and B from *Helicobacter pylori* in human volunteers. Vaccine;20(5-6):845-52.
- Buzoni-Gatel D, Debbabi H, Mennechet FJ, Martin V, Lepage AC, Schwartzman JD, Kasper LH (2001). Murine ileitis after intracellular parasite infection is controlled by TGF-beta-producing intraepithelial lymphocytes. Gastroenterology; 120(4):914-24.
- Buzoni-Gatel D, Werts C (2006). *Toxoplasma gondii* and subversion of the immune system. Trends Parasitol;22(10):448-52.
- Campieri M, Gionchetti P. 2001. Bacteria as the cause of ulcerative colitis. Gut 48:132-135.
- Chang NC, Hung SI, Hwa KY, Kato I, Chen JE, Liu CH, Chang AC (2001). A macrophage protein, Ym1, transiently expressed during inflammation is a novel mammalian lectin. J Biol Chem;276(20):17497-506.
- Chen Y, Kuchroo VK, Inobe J, Hafler DA, Weiner HL (1994). Regulatory T cell clones

- induced by oral tolerance: suppression of autoimmune encephalomyelitis. *Science*;265(5176):1237-40.
- Cole JR, Chai B, Farris RJ, Wang Q, Kulam-Syed-Mohideen AS, McGarrell DM, Bandela AM, Cardenas E, Garrity GM, Tiedje JM (2006). The ribosomal database project (RDP-II): introducing myRDP space and qualitycontrolled public data. *Nucleic Acids Res.* 2006 Nov 7; [Epub ahead of print]
- Cooper HS, Murthy SNS, Shah RS, Sedergran DJ (1993). Clinicopathologic study of dextran sulfate sodium experimental murine colitis. *Lab Invest* 69: 238–249.
- Correa P (1992). Human gastric carcinogenesis: a multistep and multifactorial process — First American Cancer Society Award Lecture on Cancer Epidemiology and Prevention. *Cancer Res*;52:6735–6740.
- Cummings JH, Pomare EW, Branch WJ, Naylor CP, Macfarlane GT (1987). Short chain fatty acids in human large intestine, portal, hepatic and venous blood. *Gut*;28:1221-1227.
- Czeslick E, Struppert A, Simm A, Sablotzki A (2006). E5564 (Eritoran) inhibits lipopolysaccharide-induced cytokine production in human blood monocytes. *Inflamm Res*;55(11):511-5.
- Dahllof I (2002). Molecular community analysis of microbial diversity. *Curr Opin Biotechnol*;13(3):213-7.
- Dalhoff A, Shalit I (2003). Immunomodulatory effects of quinolones. *Lancet Infect Dis*;3(6):359-71.
- Darfeuille-Michaud A, Neut C, Barnich N, Lederman E, Di Martino P, Desreumaux P, Gambiez L, Joly B, Cortot A, Colombel JF (1998) Presence of adherent *Escherichia coli* strains in ileal mucosa of patients with Crohn's disease. *Gastroenterology*;115:1405-1413.
- Darfeuille-Michaud A, Boudeau J, Bulois P, Neut C, Glasser AL, Barnich N, Bringer MA, Swidsinski A, Beaugerie L, Colombel JF (2004). High prevalence of adherent-invasive *Escherichia coli* associated with ileal mucosa in Crohn's disease. *Gastroenterology*;127:412-21.
- David SA (2001). Towards a rational development of anti-endotoxin agents: novel approaches to sequestration of bacterial endotoxins with small molecules. *J Mol Recognit*;14(6):370-87.
- Del Giudice G, Covacci A, Telford JL, Montecucco C,, Rappuoli R (2001). The design of vaccines against *Helicobacter pylori* and their development. *Annual Review of Immunology* 19:523-63., 523-563.
- DeLong EF, Pace NR (2001). Environmental diversity of bacteria and archaea. *Syst*

Biol;50(4):470-8.

- Dianda L, Hanby AM, Wright NA, Sebesteny A, Hayday AC, Owen MJ (1997). T cell receptor-alpha beta-deficient mice fail to develop colitis in the absence of a microbial environment. *Am J Pathol*;150(1):91-7.
- Dickson I, Alper CA (1974). Changes in serum proteinase inhibitor levels following bone surgery. *Clin Chim Acta*;54(3):381-5.
- Dieleman LA, Ridwan BU, Tennyson GS, Beagley KW, Bucy RP, Elson CO (1994). Dextran sulfate sodium-induced colitis occurs in severe combined immunodeficient mice. *Gastroenterology*;107:1643-1652.
- Dieleman LA, Palmen MJ, Akol H, Bloemena E, Pena AS, Meuwissen SG, Van Rees EP (1998). Chronic experimental colitis induced by dextran sulphate sodium (DSS) is characterized by Th1 and Th2 cytokines. *Clin Exp Immunol*;114:385-391.
- Dieleman LA, Goerres MS, Arends A, Sprengers D, Torrice C, Hoentjen F, Grenther WB, Sartor RB (2003). *Lactobacillus* GG prevents recurrence of colitis in HLA-B27 transgenic rats after antibiotic treatment. *Gut*;52:370-6.
- DiPetrillo MD, Tibbetts T, Kleanthous H, Killeen KP, Hohmann EL (1999). Safety and immunogenicity of phoP/phoQ-deleted *Salmonella typhi* expressing *Helicobacter pylori* urease in adult volunteers. *Vaccine*;18(5-6):449-59.
- Dojka MA, Harris JK, Pace NR (2000). Expanding the known diversity and environmental distribution of an uncultured phylogenetic division of bacteria. *Appl Environ Microbiol*;66:1617-1621.
- Donskey CJ, Hujer AM, Das SM, Pultz NJ, Bonomo RA, Rice LB (2003). Use of denaturing gradient gel electrophoresis for analysis of the stool microbiota of hospitalized patients. *J. Microbiol. Methods*;54:249-256.
- Drumm B, Perez-Perez GI, Blaser MJ, Sherman PM (1990). Intrafamilial clustering of *Helicobacter pylori* infection. *N Engl J Med*;322:359-363.
- Drumm B, Rowland M (2003). The epidemiology of *Helicobacter pylori*: where to from here? *J Pediatr Gastroenterol Nutr*;36(1):7-8.
- Dykhuizen DE (1998). Santa Rosalia revisited: why are there so many species of bacteria? *Antonie van Leeuwenhoek*;73:25-33.
- Eckburg PB, Bik EM, Bernstein CN, Purdom E, Dethlefsen L, Sargent M, Gill SR, Nelson KE, Relman DA (2005). Diversity of the human intestinal microbial flora. *Science*;308(5728):1635-8.
- El Omar EM, Oien K, El Nujumi A, Gillen D, Wirz A, Dahill S, Williams C, Ardill JE, McColl KE (1997). *Helicobacter pylori* infection and chronic gastric acid hyposecretion. *Gastroenterology*;113:15-24.

- Elson CO, Cong Y, Iqbal N, Weaver CT (2001). Immuno-bacterial homeostasis in the gut: new insights into an old enigma. *Semin Immunol* 13:187-94.
- Elson CO, Konrad A, Cong Y, Weaver CT (2004). Gene disruption and immunity in experimental colitis. *Inflamm Bowel Dis*;10 Suppl 1:S25-8.
- Elson CO, Cong Y, McCracken VJ, Dimmitt RA, Lorenz RG, Weaver CT (2005). Experimental models of inflammatory bowel disease reveal innate, adaptive, and regulatory mechanisms of host dialogue with the microbiota. *Immunol Rev*;206:260-76.
- Ermak TH, Giannasca PJ, Nichols R, Myers GA, Nedrud J, Weltzin R, Lee CK, Kleanthous H, Monath TP (1998). Immunization of mice with urease vaccine affords protection against *Helicobacter pylori* infection in the absence of antibodies and is mediated by MHC class II-restricted responses. *J.Exp.Med*;188:2277-2288.
- Ernst PB, Gold BD (2000). The disease spectrum of *Helicobacter pylori*: the immunopathogenesis of gastroduodenal ulcer and gastric cancer. *Annu.Rev.Microbiol.* 54:615-40., 615-640.
- Ewaschuk JB, Tejpar QZ, Soo I, Madsen K, Fedorak RN (2006a). The role of antibiotic and probiotic therapies in current and future management of inflammatory bowel disease. *Curr Gastroenterol Rep*;8(6):486-98.
- Ewaschuk JB, Dieleman LA (2006b). Probiotics and prebiotics in chronic inflammatory bowel diseases. *World J Gastroenterol*;12(37):5941-50.
- Feldman M, Cryer B, McArthur KE, Huet BA, Lee E (1996). Effects of aging and gastritis on gastric acid and pepsin secretion in humans: a prospective study. *Gastroenterology*;110:1043-1052.
- Ferrero RL, Thiberge JM, Kansau I, Wuscher N, Huerre M, Labigne A (1995). The GroES homolog of *Helicobacter pylori* confers protective immunity against mucosal infection in mice. *Proc Natl Acad Sci*;92(14):6499-503.
- Finegold SM, Rolfe RD (1983). Susceptibility testing of anaerobic bacteria. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis*;1:33-40.
- Firestein GS, Roeder WD, Laxer JA, Townsend KS, Weaver CT, Hom JT, Linton J, Torbett BE, Glasebrook AL (1989). A new murine CD4+ T cell subset with a restricted cytokine profile. *J Immunol*;143(2):518-25.
- Fischbach MA, Lin H, Zhou L, Yu Y, Abergel RJ, Liu DR, Raymond KN, Wanner BL, Strong RK, Walsh CT, Aderem A, Smith KD (2006). The pathogen-associated iroA gene cluster mediates bacterial evasion of lipocalin 2. *Proc Natl Acad Sci*;103(44):16502-7.
- Flo TH, Smith KD, Sato S, Rodriguez DJ, Holmes MA, Strong RK, Akira S, Aderem A

- (2004). Lipocalin 2 mediates an innate immune response to bacterial infection by sequestering iron. *Nature*;432(7019):917-21.
- Floch MH, Madsen KK, Jenkins DJ, Guandalini S, Katz JA, Onderdonk A, Walker WA, Fedorak RN, Camilleri M (2006). Recommendations for probiotic use. *J Clin Gastroenterol*;40(3):275-8.
- Fort MM, Mozaffarian A, Stover AG, Correia Jda S, Johnson DA, Crane RT, Ulevitch RJ, Persing DH, Bielefeldt-Ohmann H, Probst P, Jeffery E, Fling SP, Hershberg RM (2005). A synthetic TLR4 antagonist has anti-inflammatory effects in two murine models of inflammatory bowel disease. *J Immunol* 15;174(10):6416-23.
- Franchimont D, Vermeire S, El Housni H, Pierik M, Van Steen K, Gustot T, Quertinmont E, Abramowicz M, Van Gossum A, Deviere J, Rutgeerts P. (2004). Deficient host-bacteria interactions in inflammatory bowel disease ? The toll-like receptor (TLR)-4 Asp299gly polymorphism is associated with Crohn's disease and ulcerative colitis. *Gut*;53(7):987-92.
- Franks AH, Harmsen HJM, Raangs GC, Jansen GJ, Schut F, Welling GW (1998). Variations in bacterial populations in human feces measured by fluorescent in situ hybridization with group-specific 16SrRNA-targeted oligonucleotide probes. *Appl Environ Microbiol*;64:3336-3340.
- Frick JS, Zahir N, Muller M, Kahl F, Bechtold O, Lutz MB, Kirschning CJ, Reimann J, Jilge B, Bohn E, Autenrieth IB (2006). Colitogenic and non-colitogenic commensal bacteria differentially trigger DC maturation and Th cell polarization: an important role for IL-6. *Eur J Immunol*;36(6):1537-47.
- Fuchs, David. Die Rolle kommensaler Darmbakterien bei der Immunpathogenese der akuten Ileitis nach oraler Infektion der Maus mit *Toxoplasma gondi*. Medizinische Dissertationsschrift, FU/HU Berlin, in Vorbereitung.
- Fuss IJ, Neurath M, Boirivant M, Klein JS, de la Motte C, Strong SA, Fiocchi C, Strober W (1996). Disparate CD4+ lamina propria (LP) lymphokine secretion profiles in inflammatory bowel disease. Crohn's disease LP cells manifest increased secretion of IFN-gamma, whereas ulcerative colitis LP cells manifest increased secretion of IL-5. *J Immunol*;157:1261-1270
- Fuss IJ, Heller F, Boirivant M, Leon F, Yoshida M, Fichtner-Feigl S, Yang Z, Exley M, Kitani A, Blumberg RS, Mannon P, Strober W (2004). Nonclassical CD1d-restricted NK T cells that produce IL-13 characterize an atypical TH2 response in ulcerative colitis. *J Clin Invest* 113:1490-1497.
- Gerbitz A, Schultz M, Wilke A, Linde HJ, Schölmerich J, Andreesen R, Holler E (2004) Probiotic effects on experimental graft-versus-host disease: let them eat yogurt. *Blood* 103:4365-4367.

- Gewirtz AT, Madara JL (2001). Periscope up - monitoring microbes in the intestine. *Nature Immunol*;2:288-290.
- Gionchetti P, Rizzello F, Venturi A, Campieri M (2000). Probiotics in infective diarrhoea and inflammatory bowel diseases. *J Gastroenterol Hepatol*;15(5):489-93.
- Glasser AL, Boudeau J, Barnich N, Perruchot MH, Colombel JF, Darfeuille-Michaud A (2001). Adherent invasive *Escherichia coli* strains from patients with Crohn's disease survive and replicate within macrophages without inducing host cell death. *Infect Immun*;69(9):5529-37.
- Gomez-Duarte OG, Lucas B, Yan ZX, Panthel K, Haas R, Meyer TF (1998). Protection of mice against gastric colonization by *Helicobacter pylori* by single oral dose immunization with attenuated *Salmonella typhimurium* producing urease subunits A and B. *Vaccine*;16(5):460-71.
- Goodman KJ, Cockburn M (2001). The role of epidemiology in understanding the health effects of *Helicobacter pylori*. *Epidemiology*;12(2):266-71.
- Grabig A, Paclik D, Guzy C, Dankof A, Baumgart DC, Erckenbrecht J, Raupach B, Sonnenborn U, Eckert J, Schumann RR, Wiedenmann B, Dignass AU, Sturm A (2006). *Escherichia coli* strain nissle 1917 ameliorates experimental colitis via toll-like receptor 2- and toll-like receptor 4-dependent pathways. *Infect. Immun.* 74:4075-4082.
- Green LC, Wagner DA, Glogowski J, Skipper PL, Wishnok JS, Tannenbaum SR (1982). Analysis of nitrate, nitrite and [¹⁵N]nitrate in biological fluids. *Anal. Biochem* 126: 131-138
- Greenbloom SL, Steinhart AH, Greenberg GR (1998). Combination ciprofloxacin and metronidazole for active Crohn's disease. *Can J Gastroenterol* 1998;12:53-6.
- Groux H, O'Garra A, Bigler M, Rouleau M, Antonenko S, de Vries JE, Roncarolo MG (1997). A CD4+ T-cell subset inhibits antigen-specific T-cell responses and prevents colitis. *Nature*;389(6652):737-42.
- Hallman M, R  met M, Ezekowitz RA (2001). Toll-like receptors as sensors of pathogens. *Pediatr Res*;50: 315-321.
- Hampe J, Cuthbert A, Croucher PJP, Mirza MM, Mascheretti S, Fisher S, Frenzel H, King K, Hasselmeyer A, MacPherson AJS, Bridger S, van Deventer S, Forbes A, Nikolaus S, Lennard-Jones JE, Foelsch UR, Krawczak M, Lewis C, Schreiber S, Mathew CG (2001). Association between insertion mutation in NOD2 gene and Crohn's disease in german and british populations. *Lancet*;357:1925-8.
- Hans W, Schölmerich J, Gross V, Falk W (2000a). The role of the resident intestinal flora in acute and chronic dextran sulfate sodium-induced colitis in mice. *Eur. J. Gastroenterol. Hepato*;12:267-273.

- Hans W, Schölmerich J, Gross V, Falk W (2000b). Interleukin-12 induced interferon-gamma increases inflammation in acute dextran sulfate sodium induced colitis in mice. *Eur Cytokine Netw*;11(1):67-74.
- Hattori T, Mitsui H, Haga H, Wakao N, Shikano S, Gorlach K, Kasahara Y, El-Beltagy A, Hattori R (1997). Advances in soil microbial ecology and the biodiversity. *Antonie Van Leeuwenhoek*;72:21-28.
- Heimesaat MM, Bereswill S, Fischer A**, Fuchs D, Struck D, Niebergall J, Jahn HK, Dunay IR, Moter A, Gescher DM, Schumann RR, Göbel UB, Liesenfeld O (2006). Gram-negative bacteria aggravate murine small intestinal Th1-Type immunopathology following oral infection with *Toxoplasma gondii*. *J Immunol*;177:8785-8795
- Heimesaat MM, Fischer A**, Jahn HK, Niebergall J, Freudenberg M, Blaut M, Liesenfeld O, Schumann RR, Göbel UB, Bereswill S (2007). Exacerbation of Murine Ileitis By Toll-Like Receptor 4 Mediated Sensing of Lipopolysaccharide From Commensal *Escherichia coli*. *Gut*;56(7):941-8.
- Heimesaat MM, Fischer A**, Siegmund B, Kupz A, Niebergall J, Fuchs D, Jahn HK, Freudenberg M, Loddenkemper C, Batra A, Lehr HA, Liesenfeld O, Blaut M, Göbel UB, Schumann RR, Bereswill S (2007b). Shift Towards Pro-inflammatory Intestinal Bacteria Aggravates Acute Murine Colitis via Toll-like Receptors 2 and 4. *PloS ONE*;2:e662
- Hoentjen F, Harmsen HJ, Braat H, Torrice CD, Mann BA, Sartor RB, Dieleman LA (2003). Antibiotics with a selective aerobic or anaerobic spectrum have different therapeutic activities in various regions of the colon in interleukin 10 gene deficient mice. *Gut*;52:1721-7.
- Hogan SP, Seidu L, Blanchard C, Groschwitz K, Mishra A, Karow ML, Ahrens R, Artis D, Murphy AJ, Valenzuela DM, Yancopoulos GD, Rothenberg ME (2006). Resistin-like molecule beta regulates innate colonic function: barrier integrity and inflammation susceptibility. *J Allergy Clin Immunol*;118(1):257-68.
- Holler E, Rogler G, Herfarth H, Brenmoehl J, Wild PJ, Hahn J, Eissner G, Schölmerich J, Andreesen R (2004). Both donor and recipient NOD2/CARD15 mutations associate with transplant-related mortality and GvHD following allogeneic stem cell transplantation. *Blood*;104:889-894.
- Hopkins MJ, Sharp R, Macfarlane GT (2001). Age and disease related changes in intestinal bacterial populations assessed by cell culture, 16S rRNA abundance, and community fatty acid profiles. *Gut*;48:198-205.
- Hugenholtz P, Goebel BM, Pace NR (1998a). Impact of culture-independent studies on the emerging phylogenetic view of bacterial diversity. *J Bacteriol*;180:4765-4774.

- Hugenholtz P, Pitulle C, Hershberger KL, Pace NR(1998b). Novel division level bacterial diversity in a Yellowstone hot spring. *J Bacteriol* 180:366-376.
- Hugot JP, Chamaillard M, Zouali H, Lesage S, Cézard JP, Belaiche J, Almer S, Tysk C, O'Morain CA, Gassull M, Binder V, Finkel Y, Cortot A, Modigliani R, Laurent-Puig P, Gower-Rousseau C, Macry J, Colombel JF, Sahbatou M, Thomas G (2001). Association of NOD2 leucine-rich repeat variants with susceptibility to Crohn's disease *Nature*;411:599-603.
- Hugot JP (2006). CARD15/NOD2 mutations in Crohn's disease. *Ann N Y Acad Sci*;1072:9-18.
- Hunter-Cevera, JC (1998). The value of microbial diversity. *Curr Opin Microbiol*;1:278-285.
- Husebye E (2005). The pathogenesis of gastrointestinal bacterial overgrowth. *Chemotherapy*;51 Suppl 1:1-22.
- Infante-Duarte C, Horton HF, Byrne MC, Kamradt T (2000). Microbial lipopeptides induce the production of IL-17 in Th cells. *J Immunol*;165(11):6107-15.
- Ingrassia I, Leplingard A, Darfeuille-Michaud A (2005). *Lactobacillus casei* DN-114 001 inhibits the ability of adherent-invasive *Escherichia coli* isolated from Crohn's disease patients to adhere to and to invade intestinal epithelial cells. *Appl Environ Microbiol*;71(6):2880-7.
- Inohara N, Ogura Y, Chen FF, Muto A, Nunez G (2001) Human Nod1 confers responsiveness to bacterial lipopolysaccharides *J Biol Chem*;276:2551-4
- Iovanna JL & Dagorn JC (2005). The multifunctional family of sreted proteins containing a C-type lectin-like domain linked to a short N-terminal peptide. *Biochim Biophys Acta*;1723(1-3):8-18.
- Jack RS, Fan X, Bernheiden M, Rune G, Ehlers M, Weber A, Kirsch G, Mentel R, Furl B, Freudenberg M, Schmitz G, Stelter F, Schutt C (1997). Lipopolysaccharide-binding protein is required to combat a murine gram-negative bacterial infection. *Nature*;389(6652):742-5.
- Kaisho T, Akira S (2003). Regulation of dendritic cell function through Toll-like receptors. *Curr Mol Med*;3:373-385.
- Kamradt T, Burmester GR (1998). Cytokines and arthritis: is the Th1/Th2 paradigm useful for understanding pathogenesis? *J Rheumatol*;25(1):6-8.
- Kasper L, Courret N, Darche S, Luangsang S, Mennechet F, Minns L, Rachinel N, Ronet C, Buzoni-Gatel D (2004). *Toxoplasma gondii* and mucosal immunity. *Int J Parasitol*;34(3):401-9.
- Kayama S, Mitsuyama M, Sato N, Hatakeyama K (2000). Overgrowth and translocation of

- Escherichia coli* from intestine during prolonged enteral feeding in rats. J Gastroenterol;35:15-9.
- Khan IA, Schwartzman JD, Matsuura T, Kasper LH (1997). A dichotomous role for nitric oxide during acute *Toxoplasma gondii* infection in mice. Proc Natl Acad Sci U S A;94:13955-60.
- Khan IA (2007). Toll road for *Toxoplasma gondii*: the mystery continues. Trends Parasitol;23(1):1-3.
- Kim SC, Tonkonogy SL, Albright CA, Tsang J, Balish EJ, Braun J, Huycke MM, Sartor RB (2005). Variable phenotypes of enterocolitis in interleukin 10-deficient mice monoassociated with two different commensal bacteria. Gastroenterology;128:891-906.
- Kleanthous H, Lee CK, Monath TP (1998). Vaccine development against infection with *Helicobacter pylori*. Br.Med Bull. 54, 229-241.
- Kojouharoff G, Hans W, Obermeier F, Mannel DN, Andus T, Schölmerich J, Gross V, Falk W (1997). Neutralization of tumour necrosis factor (TNF) but not of IL-1 reduces inflammation in chronic dextran sulphate sodium-induced colitis in mice. Clin Exp Immunol;107(2):353-8.
- Konstantinov SR, Fitzsimons N, Vaughan EE, Akkermans ADL (2002). From composition to functionality of the intestinal microbial communities. In: Probiotics and Prebiotics: where are we going ? Tannock GW, Ed. Caister Academic Press, Wymondham, UK): 59-84.
- Kosiewicz MM, Nast CC, Krishnan A, Rivera-Nieves J, Moskaluk CA, Matsumoto S, Kozaiwa K, Cominelli F (2001). Th1-type responses mediate spontaneous ileitis in a novel murine model of Crohn's disease. J Clin Invest;107:695-702.
- Kraft C, Suerbaum S (2005). Mutation and recombination in *Helicobacter pylori*: mechanisms and role in generating strain diversity. Int J Med Microbiol;295(5):299-305.
- Kreiss C, Buclin T, Cosma M, Cortesey-Theulaz I, Michetti P (1996). Safety of oral immunisation with recombinant urease in patients with *Helicobacter pylori* infection. Lancet;347(9015):1630-1.
- Kristensen NN, Brudzewsky D, Gad M, Claesson MH (2006). Chemokines involved in protection from colitis by CD4+CD25+ regulatory T cells. Inflamm Bowel Dis;12(7):612-8.
- Lange S, Delbro DS, Jennische E, Mattsby-Baltzer I (1996). The role of the Lps gene in experimental ulcerative colitis in mice. APMIS;104(11):823-33.
- Lee DH, Zo YG, Kim SJ (1996). Non-radioactive method to study genetic profiles of

- natural bacterial communities by PCR-single-strand-conformation polymorphism. *Appl Environ Microbiol*;62:3112-3120.
- Lee SK, Josenhans C (2005). *Helicobacter pylori* and the innate immune system. *Int J Med Microbiol*;295(5):325-34.
- Lee CW, Bennouna S, Denkers EY (2006). Screening for *Toxoplasma gondii*-regulated transcriptional responses in lipopolysaccharide-activated macrophages. *Infect Immun*;74(3):1916-23.
- Lembo A, Kalis C, Kirschning CJ, Mitolo V, Jirillo E, Wagner H, Galanos C, Freudenberg MA (2003). Differential contribution of Toll-like receptors 4 and 2 to the cytokine response to *Salmonella enterica* serovar Typhimurium and *Staphylococcus aureus* in mice. *Infect Immun*;71(10):6058-62.
- Leser TD, Amenuvor JZ, Jensen TK, Lindecrona RH, Boye M, Møller K (2002). Culture-independent analysis of gut bacteria: the pig gastrointestinal tract microbiota revisited. *Appl. Environ. Microbiol*;68:673-690.
- Leveau P, Wang X, Soltesz V, Ihse I, Andersson R (1996). Alterations in intestinal motility and microflora in experimental acute pancreatitis. *Int J Pancreatol*;20:119-25.
- Liesack W & Stackebrandt E (1992). Occurrence of novel groups of the domain Bacteria as revealed by analysis of genetic material isolated from an Australian terrestrial environment. *J. Bacteriol*;174:5072–5078.
- Liesenfeld O, Kosek J, Remington JS, Suzuki Y (1996). Association of CD4+ T cell-dependent, interferon-gamma-mediated necrosis of the small intestine with genetic susceptibility of mice to peroral infection with *Toxoplasma gondii*. *J Exp Med*;184:597-607.
- Liesenfeld O, Kang H, Park D, Nguyen TA, Parkhe CV, Watanabe H, Abo T, Sher A, Remington JS, Suzuki Y (1999a). TNF-alpha, nitric oxide and IFN-gamma are all critical for development of necrosis in the small intestine and early mortality in genetically susceptible mice infected perorally with *Toxoplasma gondii*. *Parasite Immunol*;21:365-76
- Liesenfeld O (1999b). Immune responses to *Toxoplasma gondii* in the gut. *Immunobiology*;201:229-239.
- Liesenfeld O (2002). Oral Infection of C57BL/6 Mice with *Toxoplasma gondii*: A New Model of Inflammatory Bowel Disease? *J Infect Dis*; 185 (Suppl 1):S96–10
- Lodes MJ, Cong Y, Elson CO, Mohamath R, Landers CJ, Targan SR, Fort M, Hershberg RM (2004). Bacterial flagellin is a dominant antigen in Crohn's disease. *J Clin Invest*;113:1296–1306.
- Löhning M, Grogan JL, Coyle AJ, Yazdanbakhsh M, Meisel C, Gutierrez-Ramos

- JC, Radbruch A, Kamradt T (1999). T1/ST2 expression is enhanced on CD4+ T cells from schistosome egg-induced granulomas: analysis of Th cell cytokine coexpression ex vivo. *J Immunol*;162(7):3882-9.
- Lucas B, Bumann D, Walduck A, Koesling J, Develioglu L, Meyer TF, Aebischer, T (2001). Adoptive transfer of CD4+ T cells specific for subunit A of *Helicobacter pylori* urease reduces *H. pylori* stomach colonization in mice in the absence of interleukin-4 (IL-4)/IL-13 receptor signaling. *Infect.Immun.* 69, 1714-1721.
- Lucke K, Miehke S, Jacobs E, Schuppler M (2006). Prevalence of *Bacteroides* and *Prevotella* spp. in ulcerative colitis. *J Med Microbiol*;55(Pt 5):617-24.
- Ludwig W, Strunk O, Klugbauer S, Klugbauer N, Weizenegger M, Neumaier J, Bachleitner M, Schleifer KH (1998). Bacterial phylogeny based on comparative sequence analysis. *Electrophoresis*;19:554-568.
- Ludwig W, Strunk O, Westram R, Richter L, Meier H, Yadukumar, Buchner A, Lai T, Steppi S, Jobb G, Forster W, Brettske I, Gerber S, Ginhart AW, Gross O, Grumann S, Hermann S, Jost R, Konig A, Liss T, Lussmann R, May M, Nonhoff B, Reichel B, Strehlow R, Stamatakis A, Stuckmann N, Vilbig A, Lenke M, Ludwig T, Bode A, Schleifer KH (2004). ARB: a software environment for sequence data. *Nucleic Acids Res*;32(4):1363-71.
- Macagno A, Molteni M, Rinaldi A, Bertoni F, Lanzavecchia A, Rossetti C, Sallusto (2006). A cyanobacterial LPS antagonist prevents endotoxin shock and blocks sustained TLR4 stimulation required for cytokine expression. *J Exp Med*;203(6):1481-92.
- MacDonald TT, Monteleone G (2001). IL-12 and Th1 immune responses in human Peyer's patches. *Trends Immunol* 22;244.
- MacDonald TT, Monteleone G (2005). Immunity, inflammation, and allergy in the gut. *Science*;307(5717):1920-5.
- Madsen KL, Doyle JS, Tavernini MM, Jewell LD, Rennie RP, Fedorak RN (2000). Antibiotic therapy attenuates colitis in interleukin 10 gene-deficient mice. *Gastroenterology*;118:1094-105.
- Madsen KL (2001). The use of probiotics in gastrointestinal disease. *Can J Gastroenterol*;15(12):817-22.
- Madsen K, Cornish A, Soper P, McKaigney C, Jijon H, Yachimec C, Doyle J, Jewell L, De Simone C (2001). Probiotic bacteria enhance murine and human intestinal epithelial barrier function. *Gastroenterology*;121(3):580-91.
- Madsen K (2006). Probiotics and the immune response. *J Clin Gastroenterol*;40(3):232-4.
- Marchetti M, Arico B, Burrone D, Figura N, Rappuoli R, Ghiara P (1995). Development of a

- mouse model of *Helicobacter pylori* infection that mimics human disease. *Science*;267(5204):1655-8.
- Marshall BJ, Warren JR (1984). Unidentified curved bacilli in the stomach of patients with gastritis and peptic ulceration. *Lancet*;1(8390):1311-5
- Martin HM, Rhodes JM (2000). Bacteria and inflammatory bowel disease. *Curr Opin Infect Dis*;13(5):503-509.
- Martin HM, Campbell BJ, Hart CA, Mpofu C, Nayar M, Singh R, Englyst H, Williams HF, Rhodes JM (2004) Enhanced *Escherichia coli* adherence and invasion in Crohn's disease and colon cancer. *Gastroenterology*;127:80-93.
- Martinez-Medina M, Aldeguer X, Gonzalez-Huix F, Acero D, Garcia-Gil LJ (2006). Abnormal Microbiota Composition in the Ileocolonic Mucosa of Crohn's Disease Patients as Revealed by Polymerase Chain Reaction-Denaturing Gradient Gel Electrophoresis. *Inflamm Bowel Dis*;12(12):1136-1145.
- Masseret E, Boudeau J, Colombel JF, Neut C, Desreumaux P, Joly B, Cortot A, Darfeuille-Michaud A (2001). Genetically related *Escherichia coli* strains associated with Crohn's disease. *Gut*;48:320-5.
- Massol-Deyá A, Weller R, Ríos-Hernández L, Zhou JZ, Hickey RF, Tiedje JM (1997). Succession and convergence of biofilm communities in fixed-film reactors treating aromatic hydrocarbons in groundwater. *Appl Environ Microbiol* 63:270-276.
- Matsumoto S, Okabe Y, Setoyama H, Takayama K, Ohtsuka J, Funahashi H, Imaoka A, Okada Y, Umesaki Y (1998). Inflammatory bowel disease-like enteritis and caecitis in a senescence accelerated mouse P1/Yit strain. *Gut*;43(1):71-8.
- McGee HS, Agrawal DK (2006). TH2 cells in the pathogenesis of airway remodeling: regulatory T cells a plausible panacea for asthma. *Immunol Res*;35(3):219-32.
- McLoughlin RM, O'Morain CA, O'Connor HJ (2005). Eradication of *Helicobacter pylori*: recent advances in treatment. *Fundam Clin Pharmacol*;19(4):421-7.
- Medvedev AE, Henneke P, Schromm A, Lien E, Ingalls R, Fenton MJ, Golenbock DT, Vogel SN (2001). Induction of tolerance to lipopolysaccharide and mycobacterial components in Chinese hamster ovary/CD14 cells is not affected by overexpression of Toll-like receptors 2 or 4. *J Immunol*;167: 2257-2267
- Medzhitov R, Janeway CA Jr (1997). Innate Immunity: The virtues of a nonclonal system of recognition. *Cell*;91:295-8.
- Medzhitov R, Janeway CA Jr (2000). Innate immunity. *N Engl J Med*;343:338-344.
- Megraud F (1995). Transmission of *Helicobacter pylori*: faecal-oral versus oral-oral route. *Aliment Pharmacol Ther*;9(Suppl 2):85-91.
- Melgar S, Karlsson A, Michaelsson E (2005). Acute colitis induced by dextran sulfate

- sodium progresses to chronicity in C57BL/6 but not in BALB/c mice: correlation between symptoms and inflammation. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*;288(6):G1328-38.
- Melmed G, Thomas LS, Lee N, Tesfay SY, Lukasek K, Michelsen KS, Zhou Y, Hu B, Arditi M, Abreu MT (2003). Human intestinal epithelial cells are broadly unresponsive to Toll-like receptor 2-dependent bacterial ligands: implications for host-microbial interactions in the gut. *J Immunol*;170(3):1406-15.
- Mennechet FJ, Kasper LH, Rachinel N, Minns LA, Luangsay S, Vandewalle A, Buzoni-Gatel D (2004). Intestinal intraepithelial lymphocytes prevent pathogen-driven inflammation and regulate the Smad/T-bet pathway of lamina propria CD4+ T cells. *Eur J Immunol*;34(4):1059-67.
- Merlin T, Sing A, Nielsen PJ, Galanos C, Freudenberg MA (2001). Inherited IL-12 unresponsiveness contributes to the high LPS resistance of the Lps(d) C57BL/10ScCr mouse. *J Immunol*;166(1):566-73.
- Metzger WG, Mansouri E, Kronawitter M, Diescher S, Soerensen M, Hurwitz R, Bumann D, Aebischer T, Von Specht BU, Meyer TF (2004). Impact of vector-priming on the immunogenicity of a live recombinant *Salmonella enterica* serovar typhi Ty21a vaccine expressing urease A and B from *Helicobacter pylori* in human volunteers. *Vaccine*;22(17-18):2273-7.
- Michelsen, K., Aicher, A., Mohaupt, M., Kirschning, C.J. and Schumann RR (2001) Toll-like receptors (TLRs) are required for maturation of murine dendritic cells. *J Biol Chem*;276:25680-25686.
- Michetti P, Cortesy-Theulaz I, Davin C, Haas R, Vaney AC, Heitz M, Bille J, Kraehenbuhl JP, Saraga E, Blum AL (1994). Immunization of BALB/c mice against *Helicobacter felis* infection with *Helicobacter pylori* urease. *Gastroenterology*;107(4):1002-11.
- Michetti P, Kreiss C, Kotloff KL, Porta N, Blanco JL, Bachmann D, Herranz M, Saldinger PF, Cortesy-Theulaz I, Losonsky G, Nichols R, Simon J, Stolte M, Ackerman S, Monath TP, Blum AL (1999). Oral immunization with urease and *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin is safe and immunogenic in *Helicobacter pylori*-infected adults. *Gastroenterology*;116(4):804-12.
- Minns LA, Menard LC, Foureau DM, Darche S, Ronet C, Mielcarz DW, Buzoni-Gatel D, Kasper LH (2006). TLR9 is required for the gut-associated lymphoid tissue response following oral infection of *Toxoplasma gondii*. *J Immunol*;176(12):7589-97.
- Monstein HJ, Tiveljung A, Kraft CH, Borch K, Jonasson, J (2000). Profiling of bacterial flora in gastric biopsies from patients with *Helicobacter pylori*-associated gastritis and histologically normal control individuals by temperature gradient gel

- electrophoresis and 16S rDNA sequence analysis. *J. Med. Microbiol*;49:817-822.
- Monteleone G, Trapasso F, Parrello T, Biancone L, Stella A, Iuliano R, Lizza F, Fusco A, Pallone F (1999). Bioactive IL-18 expression is up-regulated in Crohn's disease. *J Immunol*;163(1):143-7.
- Mordue DG, Monroy F, La Regina M, Dinarello CA, Sibley LD (2001). Acute toxoplasmosis leads to lethal overproduction of Th1 cytokines. *J Immunol*;167(8):4574-84.
- Moter A, Hoenig C, Choi BK, Riep B, Gobel UB (1998). Molecular epidemiology of oral treponemes associated with periodontal disease. *J Clin Microbiol*;36(5):1399-403.
- Mowat C, Williams C, Gillen D, Hossack M, Gilmour D, Carswell A, Wirz A, Preston T, McColl KE (2000). Omeprazole, *Helicobacter pylori* status, and alterations in the intragastric milieu facilitating bacterial N-nitrosation. *Gastroenterology*;119:339-347.
- Mowat C, McColl KE (2001). Alterations in intragastric nitrite and vitamin C levels during acid inhibitory therapy. *Best Pract Res Clin Gastroenterol*;15(3):523-37.
- Mullarkey M, Rose JR, Bristol J, Kawata T, Kimura A, Kobayashi S, Przetak M, Chow J, Gusovsky F, Christ WJ, Rossignol DP (2003). Inhibition of endotoxin response by e5564, a novel Toll-like receptor 4-directed endotoxin antagonist. *J Pharmacol Exp Ther*;304(3):1093-102.
- Mullis K, Faloona F, Scharf S, Saiki R, Horn G, Erlich H (1992). Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Biotechnology*;24:17-27.
- Mun HS, Aosai F, Norose K, Chen M, Piao LX, Takeuchi O, Akira S, Ishikura H, Yano A (2003). TLR2 as an essential molecule for protective immunity against *Toxoplasma gondii* infection. *Int Immunol*;15(9):1081-7.
- Mun HS, Aosai F, Norose K, Piao LX, Fang H, Akira S, Yano A (2005). Toll-like receptor 4 mediates tolerance in macrophages stimulated with *Toxoplasma gondii*-derived heat shock protein 70. *Infect Immun*;73(8):4634-42.
- Murphy KM, Ouyang W, Farrar JD, Yang J, Ranganath S, Asnagli H, Afkarian M, Murphy TL (2000). Signaling and transcription in T helper development. *Annu Rev Immunol*;18:451-94.
- Murphy KM, Reiner SL (2002). The lineage decisions of helper T cells. *Nat Rev Immunol*;2(12):933-44.
- Muyzer G, de Waal EC, Uitterlinden AG (1993). Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. *Appl Environ Microbiol*;59:695-700.
- Muyzer G, Smalla K (1998). Application of denaturing gradient gel electrophoresis

- (DGGE) and temperature gradient gel electrophoresis (TGGE) in microbial ecology. *Anton. Leeuw*;73:127-141.
- Naik S, Kelly EJ, Meijer L, Pettersson S, Sanderson IR (2001). Absence of Toll-like receptor 4 explains endotoxin hyporesponsiveness in human intestinal epithelium. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*;32(4):449-53.
- Naumann M (2005). Pathogenicity island-dependent effects of *Helicobacter pylori* on intracellular signal transduction in epithelial cells. *Int J Med Microbiol*;295(5):335-41.
- Newman B, Siminovitch KA (2005). Recent advances in the genetics of inflammatory bowel disease. *Curr Opin Gastroenterol*;21:401-407.
- Niebergall, Julia. Die Rolle von TLRs und bakterieller Antigen-Erkennung in der Immunpathogenese der akuten Ileitis und Colitis der Maus. Medizinische Dissertationsschrift, FU/HU Berlin, in Vorbereitung.
- Nio J, Fujimoto W, Konno A, Kon Y, Owhashi M, Iwanaga T (2004). Cellular expression of murine Ym1 and Ym2, chitinase family proteins, as revealed by in situ hybridization and immunohistochemistry. *Histochem Cell Biol*;121(6):473-82.
- Nowrouzian F, Hesselmar B, Saalman R, Strannegard IL, Aberg N, Wold AE, Adlerberth I (2003). *Escherichia coli* in infants' intestinal microflora: colonization rate, strain turnover, and virulence gene carriage. *Pediatr Res*;54(1):8-14.
- Nübel U, Engelen B, Felske A, Snaidr J, Wieshuber A, Amann RI, Ludwig W, Backhaus H (1996). Sequence heterogeneities of genes encoding 16S rRNAs in *Paenibacillus polymyxa* detected by temperature gradient gel electrophoresis. *J Bacteriol*;178(19):5636-43.
- Obermeier F, Kojouharoff G, Hans W, Schölmerich J, Gross V, Falk W (1999). Interferon-gamma (IFN-gamma)- and tumour necrosis factor (TNF)-induced nitric oxide as toxic effector molecule in chronic dextran sulphate sodium (DSS)-induced colitis in mice. *Clin Exp Immunol*;116(2):238-45.
- Obermeier F, Dunger N, Strauch UG, Hofmann C, Bleich A, Grunwald N, Hedrich HJ, Aschenbrenner E, Schlegelberger B, Rogler G, Schölmerich J, Falk W. (2005). CpG motifs of bacterial DNA essentially contribute to the perpetuation of chronic intestinal inflammation. *Gastroenterology*;129:913-27.
- Odenbreit S (2005). Adherence properties of *Helicobacter pylori*: impact on pathogenesis and adaptation to the host. *Int J Med Microbiol*;295(5):317-24.
- Ogura Y, Bonen DK, Inohara N, Nicolae DL, Chen FF, Ramos R, Britton H, Moran T, Karaliuskas R, Duerr RH, Achkar JP, Brant SR, Bayless TM, Kirschner BS, Hanauer SB, Nunez G, Cho JH (2001). A frameshift mutation in NOD2 associated with susceptibility to Crohn's disease. *Nature* 411: 603-606.

- Ohkawara T, Takeda H, Nishihira J, Miyashita K, Nihiwaki M, Ishiguro Y, Takeda K, Akira S, Iwanaga T, Sugiyama T, Asaka M (2005). Macrophage migration inhibitory factor contributes to the development of acute dextran sulphate sodium-induced colitis in Toll-like receptor 4 knockout mice. *Clin Exp Immunol*;141(3):412-21.
- Okada Y, Tsuzuki Y, Miyazaki J, Matsuzaki K, Hokari R, Komoto S, Kato S, Kawaguchi A, Nagao S, Itoh K, Watanabe T, Miura S (2006). *Propionibacterium freudenreichii* component 1,4-dihydroxy-2-naphthoic acid(DHNA) attenuates dextran sodium sulphate induced colitis by modulation of bacterial flora and lymphocyte homing. *Gut*;55(5):681-8.
- Okahara S, Arimura Y, Yabana T, Kobayashi K, Gotoh A, Motoya S, Imamura A, Endo T, Imai K (2005). Inflammatory gene signature in ulcerative colitis with cDNA macroarray analysis. *Aliment Pharmacol Ther*;21(9):1091-7.
- Okayasu I, Hatakeyama S, Yamada M, Ohkusa T, Inahgaki Y, Nakaya R (1990). A novel method in the induction of reliable experimental acute and chronic ulcerative colitis in mice. *Gastroenterology* 98: 694–702.
- Onderdonk AB, Richardson JA, Hammer RE, Taurog JD (1998). Correlation of cecal microflora of HLA-B27 transgenic rats with inflammatory bowel disease. *Infect Immun*;66:6022-3.
- Ortega-Cava CF, Ishihara S, Rumi MA, Kawashima K, Ishimura N, Kazumori H, Udagawa J, Kadowaki Y, Kinoshita Y (2003). Strategic compartmentalization of Toll-like receptor 4 in the mouse gut. *J Immunol*;170:3977-3985.
- Ott SJ, Musfeldt M, Wenderoth DF, Hampe J, Brant O, Folsch UR, Timmis KN, Schreiber S. (2004). Reduction in diversity of the colonic mucosa associated bacterial microflora in patients with active inflammatory bowel disease. *Gut*;53:685-693.
- Otte JM, Cario E, Podolsky DK (2004). Mechanisms of cross hyporesponsiveness to Toll-like receptor bacterial ligands in intestinal epithelial cells. *Gastroenterology*;126(4):1054-70.
- Peek RM Jr, Blaser MJ (2002). *Helicobacter pylori* and gastrointestinal tract adenocarcinomas. *Nat Rev Cancer*;2(1):28-37.
- Pizarro TT, Arseneau KO, Bamias G, Cominelli F. (2003). Mouse models for the study of Crohn's disease. *Trends Mol. Med.* 9:218-222.
- Poltorak A, He X, Smirnova I, Liu MY, Van Huffel C, Du X, Birdwell D, Alejos E, Silva M, Galanos C, Freudenberg M, Ricciardi-Castagnoli P, Layton B, Beutler B (1998). Defective LPS signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr mice: mutations in Tlr4 gene. *Science*;282(5396):2085-8.
- Poltorak A, Merlin T, Nielsen PJ, Sandra O, Smirnova I, Schupp I, Boehm T, Galanos C, Freudenberg MA (2001). A point mutation in the IL-12R beta 2 gene underlies the

- IL-12 unresponsiveness of Lps-defective C57BL/10ScCr mice. *J Immunol*;167(4):2106-11.
- Pounder RE, Ng D (1995). The prevalence of *Helicobacter pylori* infection in different countries. *Aliment Pharmacol Ther*;9:L33-39.
- Pulendran B, Palucka K, Banchereau J (2001). Sensing pathogens and tuning immune responses, *Science*;293:253-256.
- Pulz M, Matussek A, Monazahian M, Tittel A, Nikolic E, Hartmann M, Bellin T, Buer J, Gunzer F (2003). Comparison of a shiga toxin enzyme-linked immunosorbent assay and two types of PCR for detection of shiga toxin-producing *Escherichia coli* in human stool specimens. *J Clin Microbiol*;41(10):4671-5.
- Rachmilewitz D, Katakura K, Karmeli F, Hayashi T, Reinus C, Rudensky B, Akira S, Takeda K, Lee J, Takabayashi K, Raz E (2004). Toll-like receptor 9 signaling mediates the anti-inflammatory effects of probiotics in murine experimental colitis. *Gastroenterology* 126:520-528.
- Radcliff FJ, Hazell SL, Kolesnikow T, Doidge C, Lee A (1997). Catalase, a novel antigen for *Helicobacter pylori* vaccination. *Infect Immun*;65(11):4668-74.
- Rakoff-Nahoum S, Paglino J, Eslami-Varzaneh F, Edberg S, Medzhitov R (2004). Recognition of commensal microflora by toll-like receptors is required for intestinal homeostasis. *Cell*;118:229-241.
- Rath HC, Herfarth HH, Ikeda JS, Grenther WB, Hamm TE Jr, Balish E, Taurog JD, Hammer RE, Wilson KH, Sartor RB (1996). Normal luminal bacteria, especially *Bacteroides* species, mediate chronic colitis, gastritis, and arthritis in HLA-B27/human beta2 microglobulin transgenic rats. *J Clin Invest*;98:945-953.
- Rath HC, Ikeda JS, Linde HJ, Schölmerich J, Wilson KH, Sartor RB (1999a). Varying cecal bacterial loads influences colitis and gastritis in HLA-B27 transgenic rats. *Gastroenterology*;116:310-319.
- Rath HC, Wilson KH, Sartor RB (1999b). Differential induction of colitis and gastritis in HLA-B27 transgenic rats selectively colonized with *Bacteroides vulgatus* or *Escherichia coli*. *Infect Immun*;67(6):2969-74.
- Rath HC, Schultz M, Freitag R, Dieleman LA, Li F, Linde HJ, Schölmerich J, Sartor RB (2001). Different subsets of enteric bacteria induce and perpetuate experimental colitis in rats and mice. *Infect Immun*;69:2277-85.
- Rescigno M, Urbano M, Valzasina B, Francolini M, Rotta G, Bonasio R, Granucci F, Kraehenbuhl JP, Ricciardi-Castagnoli P (2001). Dendritic cells express tight junction proteins and penetrate gut epithelial monolayers to sample bacteria. *Nature Immunol*;2:361-7.

- Rescigno M, Chieppa M (2005). Gut-level decisions in peace and war. *Nat Med*;11(3):254-5.
- Rescigno M, Nieuwenhuis EE (2007). The role of altered microbial signaling via mutant NODs in intestinal inflammation. *Curr Opin Gastroenterol*;23(1):21-6.
- Rioux KP, Madsen KL, Fedorak RN (2005). The role of enteric microflora in inflammatory bowel disease: human and animal studies with probiotics and prebiotics. *Gastroenterol Clin North Am*;34(3):465-82.
- Rioux KP, Fedorak RN (2006). Probiotics in the treatment of inflammatory bowel disease. *J Clin Gastroenterol*;40(3):260-3.
- Robben PM, Mordue DG, Truscott SM, Takeda K, Akira S, Sibley LD (2004). Production of IL-12 by macrophages infected with *Toxoplasma gondii* depends on the parasite genotype. *J Immunol*;172(6):3686-94.
- Rowland M & Drumm B (1998). Clinical significance of *Helicobacter infection* in children. *Br Med Bull*;54:95-103.
- Rossignol DP, Wasan KM, Choo E, Yau E, Wong N, Rose J, Moran J, Lynn M (2004). Safety, pharmacokinetics, pharmacodynamics, and plasma lipoprotein distribution of eritoran (E5564) during continuous intravenous infusion into healthy volunteers. *Antimicrob Agents Chemother*;48(9):3233-40.
- Rupnow MF, Owens DK, Shachter R, Parsonnet J (1999). *Helicobacter pylori* vaccine development and use: a cost-effectiveness analysis using the Institute of Medicine Methodology. *Helicobacter*;4(4):272-80.
- Rupnow MF, Shachter RD, Owens DK, Parsonnet J (2001). Quantifying the population impact of a prophylactic *Helicobacter pylori* vaccine. *Vaccine*;20(5-6):879-85.
- Ryckman C, Vandal K, Rouleau P, Talbot M, Tessier PA (2003). Proinflammatory activities of S100: proteins S100A8, S100A9, and S100A8/A9 induce neutrophil chemotaxis and adhesion. *J Immunol*;170(6):3233-42.
- Sakagami T, Dixon M, O'Rourke J, Howlett R, Alderuccio F, Vella J, Shimoyama T, Lee A (1996). Atrophic gastric changes in both *Helicobacter felis* and *Helicobacter pylori* infected mice are host dependent and separate from antral gastritis. *Gut*;39(5):639-48.
- Salfinger M (1980). Possibilities and limits of the proof by culture of intestinal bacterial infections. *Ther. Umsch.* 37: 181-186.
- Salzman NH, De Jong H, Paterson Y, Harmsen HJ, Welling GW, Bos NA (2002). Analysis of 16S libraries of mouse gastrointestinal microflora reveals a large new group of mouse intestinal bacteria. *Microbiology*;148:3651-3660.
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T (1989). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold

- Spring Harbor Laboratory Press, NY, Vol. 1, 2, 3.
- Sartor RB (1995). Current concepts of the etiology and pathogenesis of ulcerative colitis and Crohn's disease. *Gastroenterol Clin North Am*;24:475-507.
- Sartor RB (1997). Review article: How relevant to human inflammatory bowel disease are current animal models of intestinal inflammation? *Aliment Pharmacol Ther* 11 (Suppl 3):89-97.
- Sartor RB (1997a). The influence of normal microbial flora on the development of chronic mucosal inflammation. *Res Immunol*;148(8-9):567-76.
- Sartor RB (2004). Therapeutic manipulation of the enteric microflora in inflammatory bowel diseases: antibiotics, probiotics, and prebiotics. *Gastroenterology*;126:1620-1633.
- Sartor RB (2005). Probiotic therapy of intestinal inflammation and infections. *Curr Opin Gastroenterol*;21:44-50.
- Sartor RB (2006). Mechanisms of disease: pathogenesis of Crohn's disease and ulcerative colitis. *Nat Clin Pract Gastroenterol Hepatol*;3(7):390-407.
- Scanga CA, Aliberti J, Jankovic D, Tilloy F, Bennouna S, Denkers EY, Medzhitov R, Sher A (2002). Cutting edge: MyD88 is required for resistance to *Toxoplasma gondii* infection and regulates parasite-induced IL-12 production by dendritic cells. *J Immunol*;168(12):5997-6001.
- Schultz M, Tonkonogy SL, Sellon RK, Veltkamp C, Godfrey VL, Kwon J, Grenther WB, Balish E, Horak I, Sartor RB (1999). IL-2-deficient mice raised under germfree conditions develop delayed mild focal intestinal inflammation. *Am J Physiol*;276(6 Pt 1):G1461-72.
- Schultz M, Strauch UG, Linde HJ, Watzl S, Obermeier F, Gottl C, Dunger N, Grunwald N, Schölmerich J, Rath HC (2004). Preventive effects of *Escherichia coli* strain Nissle 1917 on acute and chronic intestinal inflammation in two different murine models of colitis. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 11:372-378.
- Schuppler M, Lotzsch K, Waidmann M, Autenrieth IB. (2004). An abundance of *Escherichia coli* is harbored by the mucosa-associated bacterial flora of interleukin-2-deficient mice. *Infect Immun*;72:1983-1990.
- Segal ED, Shon J, Tompkins LS (1992). Characterization of *Helicobacter pylori* urease mutants. *Infect Immuno*;60:1883-1889.
- Seksik P, Rigottier-Gois L, Gramet G, Sutren M, Pochart P, Marteau P, Jian R, Dore J (2003). Alterations of the dominant faecal bacterial groups in patients with Crohn's disease of the colon. *Gut*;52:237-242.
- Sellon RK, Tonkonogy S, Schultz M, Dieleman LA, Grenther W, Balish E, Rennick DM,

- Sartor RB (1998). Resident enteric bacteria are necessary for development of spontaneous colitis and immune system activation in interleukin-10-deficient mice. *Infect Immun*;66(11):5224-31.
- Sghir A, Gramet G, Suau A, Rochet V, Pochart P, Dore J (2000). Quantitation of bacterial groups within human fecal flora by oligonucleotide probe hybridization. *Appl Environ Microbiol*;66: 2236-6
- Siegmund B, Fantuzzi G, Rieder F, Gamboni-Robertson F, Lehr HA, Hartmann G, Dinarello CA, Endres S, Eigler A (2001). Neutralization of interleukin-18 reduces severity in murine colitis and intestinal IFN-gamma and TNF-alpha production. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*;281:R1264-1273
- Silverman N, Maniatis T (2001). NF- κ B signaling pathways in mammalian and inst innate immunity. *Genes & Dev*;15:2321-42
- Simon GL, Gorbach SL (1984). Intestinal flora in health and disease. *Gastroenterology*;86:174-193.
- Sokol H, Lepage P, Seksik P, Dore J, Marteau P (2006a). Temperature gradient gel electrophoresis of fecal 16S rRNA reveals active *Escherichia coli* in the microbiota of patients with ulcerative colitis. *J Clin Microbiol*;44(9):3172-7.
- Sokol H, Seksik P, Rigottier-Gois L, Lay C, Lepage P, Podglajen I, Marteau P, Dore J (2006b). Specificities of the fecal microbiota in inflammatory bowel disease. *Inflamm Bowel Dis*;12(2):106-11.
- Solnick JV, Josenhans C, Suerbaum S, Tompkins LS, Labigne A (1995). Construction and Characterization of an isogenic urease-negative mutant of *Helicobacter mustelae*. *Infect Immun*;63:3718-3721.
- Stingl K, De Reuse H (2005). Staying alive overdosed: how does *Helicobacter pylori* control urease activity? *Int J Med Microbiol*;295(5):307-15.
- Strober W (2004). Epithelial cells pay a Toll for protection. *Nat Med*;10(9):898-900.
- Suerbaum S, Michetti P (2002). *Helicobacter pylori* infection. *N Engl J Med*;347:1175-1186.
- Sun YQ, Monstein HJ, Nilsson LE, Petersson F, Borch K (2003). Profiling and Identification of Eubacteria in the Stomach of Mongolian Gerbils With and Without *Helicobacter pylori* Infection. *Helicobacter*;8:149-157.
- Sun YQ, Petersson F, Monstein HJ, Soderholm JD, Rehfeld JF, Borch K (2005). Long-term morpho-functional development of *Helicobacter pylori*-induced gastritis in Mongolian gerbils. *Scand J Gastroenterol*;40(10):1157-67.
- Sunahori K, Yamamura M, Yamana J, Takasugi K, Kawashima M, Yamamoto H, Chazin WJ, Nakatani Y, Yui S, Makino H (2006). The S100A8/A9 heterodimer amplifies

- proinflammatory cytokine production by macrophages via activation of nuclear factor kappa B and p38 mitogen-activated protein kinase in rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther*;8(3):R69.
- Sundberg JP, Elson CO, Bedigian H, Birkenmeier EH (1994). Spontaneous, heritable colitis in a new substrain of C3H/HeJ mice. *Gastroenterology*;107(6):1726-35.
- Suzuki Y, Sher A, Yap G, Park D, Neyer LE, Liesenfeld O, Fort M, Kang H, Gufwoli E (2000). IL-10 is required for prevention of necrosis in the small intestine and mortality in both genetically resistant BALB/c and susceptible C57BL/6 mice following peroral infection with *Toxoplasma gondii*. *J Immunol*;164:5375-82.
- Suzuki M, Hisamatsu T, Podolsky DK (2003). Gamma interferon augments the intracellular pathway for lipopolysaccharide (LPS) recognition in human intestinal epithelial cells through coordinated up-regulation of LPS uptake and expression of the intracellular Toll-like receptor 4-MD-2 complex. *Infect Immun*;71(6):3503-11.
- Swidsinski A, Ladhoff A, Pernthaler A, Swidsinski S, Loening-Baucke V, Ortner M, Weber J, Hoffmann U, Schreiber S, Dietel M, Lochs H (2002). Mucosal flora in inflammatory bowel disease. *Gastroenterology*;122:44-54.
- Swidsinski A, Weber J, Loening-Baucke V, Hale LP, Lochs H (2005). Spatial organization and composition of the mucosal flora in patients with inflammatory bowel disease. *J Clin Microbiol*;43:3380-9.
- Takeda K, Kaisho T, Akira S (2003). Toll-like receptors. *Annu Rev Immunol* 21:335-376.
- Takeda K (2005). Evolution and integration of innate immune recognition systems: the Toll-like receptors. *J Endotoxin Res*;11(1):51-5.
- Tannock GW, Savage DC (1974). Influences of dietary and environmental stress on microbial populations in the murine gastrointestinal tract. *Infect.Immun*;9: 591-598.
- Tannock GW (1999). Analysis of the intestinal microflora: a renaissance. *Anton. Leeuw*;76(1-4):265-78.
- Tannock GW (2001). Molecular assessment of intestinal microflora. *Am J Clin Nutr*;73(2 Suppl):410S-414S.
- Targan SR, Landers CJ, Yang H, Lodes MJ, Cong Y, Papadakis KA, Vasilias E, Elson CO, Hersherberg RM (2005). Antibodies to CBir1 flagellin define a unique response that is associated independently with complicated Crohn's disease. *Gastroenterology*;128:2020-2028
- Tarpila E, Nystrom PO, Franzen L, Ihse I (1993). Bacterial translocation during acute pancreatitis in rats. *Eur J Surg*;159:109-13.
- Thompson-Chagoyan OC, Maldonado J, Gil A (2005). Aetiology of inflammatory bowel

- disease (IBD): role of intestinal microbiota and gut-associated lymphoid tissue immune response. *Clin Nutr*;24(3):339-52.
- Tlaskalova-Hogenova H, Tuckova L, Mestecky J, Kolinska J, Rossmann P, Stepankova R, Kozakova H, Hudcovic T, Hrnecir T, Frolova L, Kverka M (2005a). Interaction of mucosal microbiota with the innate immune system. *Scand J Immunol*;62 Suppl 1:106-13.
- Tlaskalova-Hogenova H, Stepankova R, Hudcovic T, Tuckova L, Cukrowska B, Lodinova-Zadnikova R, Kozakova H, Rossmann P, Bartova J, Sokol D, Funda DP, Borovska D, Rehakova Z, Sinkora J, Hofman J, Drastich P, Kokesova A (2005b). Commensal bacteria (normal microflora), mucosal immunity and chronic inflammatory and autoimmune diseases. *Immunol Lett*;93(2-3):97-108.
- Torok HP, Glas J, Tonenchi L, Mussack T, Folwaczny C (2004). Polymorphisms of the lipopolysaccharide-signaling complex in inflammatory bowel disease: association of a mutation in the Toll-like receptor 4 gene with ulcerative colitis. *Clin Immunol*;112:85-91.
- Torsvik V, Goksoyr J, Daae FL (1990a). High diversity in DNA of soil bacteria. *Appl Environ Microbiol*;56(3):782-7.
- Torsvik V, Salte K, Sorheim R, Goksoyr J (1990b). Comparison of phenotypic diversity and DNA heterogeneity in a population of soil bacteria. *Appl Environ Microbiol*;56(3):776-81.
- Torsvik V, Daae FL, Sandaa RA, Ovreas L (1998). Novel techniques for analysing microbial diversity in natural and perturbed environments. *J Biotechnol*;64(1):53-62.
- Torsvik V, Ovreas L (2002). Microbial diversity and function in soil: from genes to ecosystems. *Curr Opin Microbiol*;5(3):240-5.
- Trebesius K, Panthel K, Strobel S, Vogt K, Faller G, Kirchner T, Kist M, Heesemann J, Haas R (2000). Rapid and specific detection of *Helicobacter pylori* macrolide resistance in gastric tissue by fluorescent in situ hybridisation. *Gut* 46, 608-614.
- Tsubery H, Ofek I, Cohen S, Fridkin M (2000). The functional association of polymyxin B with bacterial lipopolysaccharide is stereospecific: studies on polymyxin B nonapeptide. *Biochemistry*;39:11837-44.
- Tsubery H, Ofek I, Cohen S, Fridkin M (2000a). Structure-function studies of polymyxin B nonapeptide: implications to sensitization of gram-negative bacteria. *J Med Chem*;43(16):3085-92.
- Tsubery H, Ofek I, Cohen S, Eisenstein M, Fridkin M (2002). Modulation of the hydrophobic domain of polymyxin B nonapeptide: effect on outer-membrane permeabilization and lipopolysaccharide neutralization. *Mol*

Pharmacol;62(5):1036-42.

- Tsubery H, Yaakov H, Cohen S, Giterman T, Matityahou A, Fridkin M, Ofek I (2005). Neopeptide antibiotics that function as opsonins and membrane-permeabilizing agents for gram-negative bacteria. *Antimicrob Agents Chemother*;49(8):3122-8.
- Tsuzuki H, Tani T, Ueyama H, Kodama M (2001). Lipopolysaccharide: neutralization by polymyxin B shuts down the signaling pathway of nuclear factor kappa B in peripheral blood mononuclear cells, even during activation. *J Surg Res*;100:127-34.
- Uematsu S, Akira S (2006). Toll-like receptors and innate immunity. *J Mol Med*;84(9):712-25.
- Vakil N (2005) Primary and secondary treatment for *Helicobacter pylori* in the United States. *Rev Gastroenterol Disord*;5:67-72.
- Vandal K, Rouleau P, Boivin A, Ryckman C, Talbot M, Tessier PA (2003). Blockade of S100A8 and S100A9 suppresses neutrophil migration in response to lipopolysaccharide. *J Immunol*;171(5):2602-9.
- Van de Merwe JP, Stegemann JH, Hazenberg MP (1983). The resident fecal flora is determined by genetic characteristics of the host. Implications for Crohn's disease? *Ant. Leeuw*;49:119
- Vaughan EE, Schut F, Heilig HG, Zoetendal EG, De Vos WM & Akkermans AD (2000). A molecular view of the intestinal ecosystem. *Curr Iss Intest Microbiol*;1:1-12.
- Vogel SN, Hansen CT, Rosenstreich DL (1979). Characterization of a congenitally LPS-resistant, athymic mouse strain. *J Immunol*;122(2):619-22.
- Von Wintzingerode F, Göbel UB, Stackebrandt E (1997). Determination of microbial diversity in environmental samples: pitfalls of PCR-based rRNA analysis. *FEMS Microbiol Rev*;21:213-229.
- Waidmann M, Bechtold O, Frick JS, Lehr HA, Schubert S, Dobrindt U, Loeffler J, Bohn E, Autenrieth IB (2003). *Bacteroides vulgatus* protects against *Escherichia coli*-induced colitis in gnotobiotic interleukin-2-deficient mice. *Gastroenterology*;125:162-77.
- Wallin RPA, Lundqvist A, More SH, von Bonin A, Kiessling R, Ljunggren HG (2002). Heat shock proteins as activators of the innate immune system. *Trends Immunol*;23:130.
- Walter J, Tannock GW, Tilsala-Timisjarvi A, Rodtong S, Loach DM, Munro K, Alatossava T (2000). Detection and identification of gastrointestinal *Lactobacillus* species by using denaturing gradient gel electrophoresis and species-specific PCR primers. *Appl Environ Microbiol*;66(1):297-303.

- Walter J, Hertel C, Tannock GW, Lis CM, Munro K, Hammes WP (2001). Detection of *Lactobacillus*, *Pediococcus*, *Leuconostoc*, and *Weissella* species in human feces by using group-specific PCR primers and denaturing gradient gel electrophoresis. *Appl Environ Microbiol*;67(6):2578-85.
- Wang XD, Guo WD, Wang Q, Andersson R, Ekblad E, Soltesz V, Bengmark S (1994). The association between enteric bacterial overgrowth and gastrointestinal motility after subtotal liver resection or portal vein obstruction in rats. *Eur J Surg*;160:153-60.
- Ward DM, Weller R, Bateson MM (1990). 16S rRNA sequences reveal numerous uncultured microorganisms in a natural community. *Nature*;345:63-65.
- Ward DM (1998). A natural species concept for prokaryotes. *Curr Opin Microbiol*;1:271-277.
- Warren HS, Kania SA, Siber GR (1985). Binding and neutralization of bacterial lipopolysaccharide by colistin nonapeptide. *Antimicrob Agents Chemother*;28:107-12.
- Watanabe T, Kitani A, Murray PJ, Strober W (2004). NOD2 is a negative regulator of Toll-like receptor 2-mediated T helper type 1 responses. *Nat Immunol*;5:800-808.
- Weisburg WG, Barns SM, Pelletier DA, Lane DJ (1991). 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *J Bacteriol*;173:697-703.
- Welsh J, McClelland M (1990). Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. *Nucleic Acids Res*;18(24):7213-8.
- Werts C, Tapping RI, Mathison JC, Chuang TH, Kravchenko V, Saint Girons I, Haake DA, Godowski PJ, Hayashi F, Ozinsky A, Underhill DM, Kirschning CJ, Wagner H, Aderem A, Tobias PS, Ulevitch RJ (2001). Leptospiral lipopolysaccharide activates cells through a TLR2-dependent mechanism. *Nat Immunol*;2(4):346-52.
- Williams C (2001). Occurrence and significance of gastric colonization during acid-inhibitory therapy. *Best Pract Res Clin Gastroenterol*; 15, 511-521.
- Wirtz S, Neurath, MF (2000). Animal models of intestinal inflammation: new insights into the molecular pathogenesis and immunotherapy of inflammatory bowel disease. *Int J Colorectal Dis*;15:144-60
- Xia X, Bollinger J, Ogram A (1995). Molecular genetic analysis of the response of three soil microbial communities to the application of 2,4-D. *Mol Ecol*;4:17-28.
- Yarovinsky F, Zhang D, Andersen JF, Bannenberg GL, Serhan CN, Hayden MS, Hieny S, Sutterwala FS, Flavell RA, Ghosh S, Sher A (2005). TLR11 activation of dendritic cells by a protozoan profilin-like protein. *Science*;308 (5728):1626-9.
- Yarovinsky F, Sher A (2006). Toll-like receptor recognition of *Toxoplasma gondii*. *Int J*

- Parasitol;36(3):255-9.
- Zanin-Zhorov A, Bruck R, Tal G, Oren S, Aeed H, HersHKoviz R, Cohen IR, Lider O (2005). Heat shock protein 60 inhibits Th1-mediated hepatitis model via innate regulation of Th1/Th2 transcription factors and cytokines. *J Immunol*;174(6):3227-36.
- Zanin-Zhorov A, Cahalon L, Tal G, Margalit R, Lider O, Cohen IR (2006). Heat shock protein 60 enhances CD4⁺ CD25⁺ regulatory T cell function via innate TLR2 signaling. *J Clin Invest*;116(7):2022-32.
- Zavros Y, Rieder G, Ferguson A, Merchant JL (2002a). Gastritis and hypergastrinemia due to *Acinetobacter lwoffii* in mice. *Infect.Immun*;70:2630-2639.
- Zavros Y, Rieder G, Ferguson A, Samuelson LC, Merchant JL (2002b). Genetic or chemical hypochlorhydria is associated with inflammation that modulates parietal and G-cell populations in mice. *Gastroenterology*;122:119-133.
- Zhang D, Zhang G, Hayden MS, Greenblatt MB, Bussey C, Flavell RA, Ghosh S (2004). A toll-like receptor that prevents infection by uropathogenic bacteria. *Science*;303(5663):1522-6.
- Zhou JS, Friend DS, Feldweg AM, Daheshia M, Li L, Austen KF, Katz HR (2003). Prevention of lipopolysaccharide-induced microangiopathy by gp49B1: evidence for an important role for gp49B1 expression on neutrophils. *J Exp Med*;198(8):1243-51.
- Zoetendal EG, Akkermans AD, De Vos WM (1998). Temperature gradient gel electrophoresis analysis of 16S rRNA from human fecal samples reveals stable and host-specific communities of active bacteria. *Appl Environ Microbiol*;64(10):3854-9.
- Zoetendal EG, Ben-Amor K, Akkermans AD, Abee T, de Vos WM (2001). DNA isolation protocols affect the detection limit of PCR approaches of bacteria in samples from the human gastrointestinal tract. *Syst Appl Microbiol*;24(3):405-10.
- Zoetendal EG, von Wright A, Vilpponen-Salmela T, Ben-Amor K, Akkermans AD, de Vos WM (2002a). Mucosa-associated bacteria in the human gastrointestinal tract are uniformly distributed along the colon and differ from the community recovered from feces. *Appl Environ Microbiol*;68(7):3401-7.
- Zoetendal EG, Ben-Amor K, Harmsen HJ, Schut AD, Akkermans AD, de Vos WM (2002b). Quantification of uncultured *Ruminococcus obeum*-like bacteria in human fecal samples by fluorescent in situ hybridization and flow cytometry using 16S rRNA-targeted probes. *Appl Environ Microbiol*;68(9):4225-32.
- Zoetendal EG, Cheng B, Koike S, Mackie RI (2004a). Molecular microbial ecology of the gastrointestinal tract: from phylogeny to function. *Curr Issues Intest Microbiol*;5(2):31-47.

Zoetendal EG, Collier CT, Koike S, Mackie RI, Gaskins HR (2004b). Molecular ecological analysis of the gastrointestinal microbiota: a review. *J Nutr*;134(2):465-72.

Zoetendal EG, Vaughan EE, de Vos WM (2006). A microbial world within us. *Mol Microbiol*;59(6):1639-50.

Anhang

Tab. A: Entzündungs-assoziierte Expression bei Wildtyp BL10 und TLR-defizienten Tieren (Signal log Verhältnis als Increase >1,5)

WT BL10 Tag 8p.i. vs naiv Signal log Verhältnis	WT BL10 Tag 8p.i. vs naiv Änderung	TL R2-/- Tag 8p.i. vs naiv Signal log Verhältnis	TL R2-/- Tag 8p.i. vs naiv Änderung	TL R4-/- Tag 8p.i. vs naiv Signal log Verhältnis	TL R4-/- Tag 8p.i. vs naiv Änderung	Gensymbol	Genbezeichnung
3,03	I	2,36	NC	1,18	I	Slc15a3	solute carrier family 15, member 3
4,2	I	0,39	NC	-3,78	NC	Pcdha1-12	protocadherin alpha 1-12, alpha subfamily C 1+2
3,75	I	3,56	I	1,89	NC	Clecsf8	C-type (calcium dependent, carbohydrate recognition domain) lectin, superfamily 8
3,5	I	1,27	NC	2,01	NC	Ccl7	chemokine (C-C motif) ligand 7
3,9	I	-3,44	NC	0,39	NC	Zfp354b	zinc finger protein 354B
3,92	I	-0,33	NC	-0,26	NC	Prkcc	protein kinase C, gamma
4,82	I	0,01	NC	-1,4	NC	Adarb1	adenosine deaminase, RNA-specific, B1
4,6	I	3,31	NC	-0,95	NC	Sorcs1	VPS10 domain receptor protein SORCS 1
3,45	I	1,34	I	0,3	NC	Racgap1	Rac GTPase-activating protein 1
3,98	I	3,14	I	3,64	I	Ly6c	lymphocyte antigen 6 complex, locus C
5,84	I	2,86	I	1,13	NC	Ccl4	chemokine (C-C motif) ligand 4
3,55	I	-0,41	NC	3,04	NC	Myo1f	myosin IF
5,49	I	-0,9	NC	0,19	NC	Pdgfra	platelet derived growth factor receptor, alpha polypeptide
3,75	I	1,27	NC	0,57	NC	Icos	inducible T-cell co-stimulator
3,13	I	0,2	NC	0,17	NC	Slc43a3	solute carrier family 43, member 3

WT BL10 Tag 8p.i. vs naiv Signal log Verhältnis	WT BL10 Tag 8p.i. vs naiv Änderung	TL R2-/- Tag 8p.i. vs naiv Signal log Verhältnis	TL R2-/- Tag 8p.i. vs naiv Änderung	TL R4-/- Tag 8p.i. vs naiv Signal log Verhältnis	TL R4-/- Tag 8p.i. vs naiv Änderung	Gensymbol	Genbezeichnung
6,07	I	4,32	I	1,55	NC	Serpina3n	serine (or cysteine) proteinase inhibitor, clade A, 3N
6,07	I	3,13	I	1,49	I	S100a8	S100 calcium binding protein A8 (calgranulin A)
5,42	I	0,13	NC	1,32	NC	Sell	selectin, lymphocyte
4,49	I	1,65	NC	1,82	I	Arg1	arginase 1, liver
3,62	I	1,14	NC	2,32	NC	Ms4a11	membrane-spanning 4-domains, subfamily A, member 11
4,26	I	1,58	NC	2,85	NC	Ccr1	chemokine (C-C motif) receptor 1
3,48	I	0,18	NC	-0,22	NC	Tecta	tectorin alpha
3,44	I	1,71	I	2,38	I	Ubd	ubiquitin D
7,25	I	5,06	I	5,08	I	Chi3l3	chitinase 3-like 3
6,6	I	4,06	I	3,6	I	Clecsf9	C-type (calcium dependent, carbohydrate recognition domain) lectin, superfamily member 9
5,31	I	5,48	NC	4,34	I	Ccl2	chemokine (C-C motif) ligand 2
6,69	I	3,5	I	1,73	NC	Gp49a /// Lilrb4	glycoprotein 49 A /// leukocyte immunoglobulin-like receptor, subfamily B, member 4
3,31	I	2,33	I	2,66	I	Indo	indoleamine-pyrrole 2,3 dioxygenase
3,29	I	0,66	I	1,24	NC	Tgfb1	transforming growth factor, beta 1
5,9	I	3,13	NC	0,52	NC	Ms4a4c	membrane-spanning 4-domains, subfamily A, member 4C

WT BL10 Tag 8p.i. vs naiv Signal log Verhältnis	WT BL10 Tag 8p.i. vs naiv Änderung	TL R2-/- Tag 8p.i. vs naiv Signal log Verhältnis	TL R2-/- Tag 8p.i. vs naiv Änderung	TL R4-/- Tag 8p.i. vs naiv Signal log Verhältnis	TL R4-/- Tag 8p.i. vs naiv Änderung	Gensymbol	Genbezeichnung
4,55	I	2,47	I	1,53	I	Fpr-rs2	formyl peptide receptor, related sequence 2
3,55	I	1,56	I	0,49	NC	Pnn	pinin
3,01	I	1,89	I	2,65	I	C3	complement component 3
4,1	I	-0,41	NC	0,95	NC	C1s	complement component 1, s subcomponent
4,62	I	3,51	I	4,15	I	Pirb	paired-Ig-like receptor B
3,78	I	1,88	NC	3,94	NC	S100a4	S100 calcium binding protein A4
3,02	I	1,53	NC	1,42	I	Serpina3g	serine (or cysteine) proteinase inhibitor, clade A,3G
3,02	I	2,06	I	2,17	I	Fcrl3	Fc receptor-like 3
4,11	I	-0,7	NC	-2,76	NC	Ntrk3	Neurotrophic tyrosine kinase, receptor, type 3
6,28	I	7	I	4,73	I	Chi3l4 /// Chi3l3	chitinase 3-like 4 /// chitinase 3-like 3
3,17	I	1,68	I	0,47	NC	Lst1	leukocyte specific transcript 1
5,49	I	2,07	NC	0,76	NC	Slnf4	schlafen 4
4,17	I	-2,07	NC	-3,79	NC	Cspg2	chondroitin sulfate proteoglycan 2
8,25	I	4,14	I	2,21	I	Lcn2	lipocalin 2
3,37	I	-4,07	NC	0,02	NC	Irxa2	Iroquois related homeobox 2 (Drosophila)

WT BL10 Tag 8p.i. vs naiv Signal log Verhältnis	WT BL10 Tag 8p.i. vs naiv Änderung	TL R2-/- Tag 8p.i. vs naiv Signal log Verhältnis	TL R2-/- Tag 8p.i. vs naiv Änderung	TL R4-/- Tag 8p.i. vs naiv Signal log Verhältnis	TL R4-/- Tag 8p.i. vs naiv Änderung	Gensymbol	Genbezeichnung
5,56	I	1,06	NC	0,52	NC	Dhx30	DEAH (Asp-Glu-Ala-His) box polypeptide 30
3,52	I	2	NC	-0,36	NC	Ifitm6	interferon induced transmembrane protein 6
4,96	I	1,68	NC	3,84	NC	Vcam1	vascular cell adhesion molecule 1
4,14	I	1,44	NC	3,45	NC	Hmox1	heme oxygenase (decycling) 1
4,02	I	0,52	NC	0,82	NC	Gpnmb	glycoprotein (transmembrane) nmb
3,32	I	1,14	NC	-0,27	NC	Pla2g4a	phospholipase A2, group IVA (cytosolic, calcium-dependent)
3,26	I	1,9	NC	1,86	I	Fcgr3	Fc receptor, IgG, low affinity III
4,31	I	1	I	2,37	NC	Il15ra	interleukin 15 receptor, alpha chain
7,08	I	5,3	I	4,84	I	S100a9	S100 calcium binding protein A9 (calgranulin B)
5,71	I	1,52	I	0,63	I	Cxcl13	chemokine (C-X-C motif) ligand 13
4,44	I	2,2	I	3,56	I	Tgtp	T-cell specific GTPase
4,07	I	2,6	NC	-2,09	NC	Dck	deoxycytidine kinase
5,39	I	-0,73	NC	2,94	NC	Spp1	secreted phosphoprotein 1
4,99	I	1,26	NC	1,49	I	F10	coagulation factor X
6,16	I	-0,18	NC	-0,15	NC	Timp1	tissue inhibitor of metalloproteinase 1
5,49	I	2,33	NC	0,25	NC	Csf2rb2	colony stimulating factor 2 receptor, beta 2, low-affinity (granulocyte-macrophage)

WT BL10 Tag 8p.i. vs naiv Signal log Verhältnis	WT BL10 Tag 8p.i. vs naiv Änderung	TL R2-/- Tag 8p.i. vs naiv Signal log Verhältnis	TL R2-/- Tag 8p.i. vs naiv Änderung	TL R4-/- Tag 8p.i. vs naiv Signal log Verhältnis	TL R4-/- Tag 8p.i. vs naiv Änderung	Gensymbol	Genbezeichnung
4,57	I	0,77	NC	1,47	NC	Sipa1	signal-induced proliferation associated gene 1
3,73	I	0,45	I	1,08	I	Tnfaip2	tumor necrosis factor, alpha-induced protein 2
6,1	I	3,89	I	3,98	I	Ly6d	lymphocyte antigen 6 complex, locus D
3,09	I	1,97	I	2,29	I	Igtp	interferon gamma induced GTPase
3,73	I	2,2	I	2,16	I	Ly6a	lymphocyte antigen 6 complex, locus A
4	I	2,74	I	1,56	I	Cxcl13	chemokine (C-X-C motif) ligand 13
4,69	I	1,18	NC	3,09	I	Fcgr1	Fc receptor, IgG, high affinity I
4,66	I	2,64	I	3,32	I	Gbp2	guanylate nucleotide binding protein 2
6,26	I	2,37	I	2,75	I	Cxcl9	chemokine (C-X-C motif) ligand 9
4,4	I	0,23	NC	2,54	NC	Osmr	oncostatin M receptor
3,29	I	2,43	I	2,29	I	Ifi1	interferon inducible protein 1
3,07	I	1,22	NC	1,04	I	Ms4a6b	membrane-spanning 4-domains, subfamily A, member 6B
3,6	I	0,63	NC	-0,34	NC	Qprt	quinolinate phosphoribosyltransferase
3,71	I	1,92	I	2,16	I	Cxcl10	chemokine (C-X-C motif) ligand 10
5,08	I	2,61	I	3,36	I	AW111922	expressed sequence AW111922
3,43	I	0,56	NC	0,32	NC	Gzmb	granzyme B

WT BL10 Tag 8p.i. vs naiv Signal log Verhältnis	WT BL10 Tag 8p.i. vs naiv Änderung	TL R2-/- Tag 8p.i. vs naiv Signal log Verhältnis	TL R2-/- Tag 8p.i. vs naiv Änderung	TL R4-/- Tag 8p.i. vs naiv Signal log Verhältnis	TL R4-/- Tag 8p.i. vs naiv Änderung	Gensymbol	Genbezeichnung
4,66	I	-1,5	NC	-0,56	NC	Il1b	interleukin 1 beta
3,6	I	0,38	NC	0,36	NC	Mark1	MAP/microtubule affinity-regulating kinase 1
3,27	I	1,26	NC	0,71	NC	Ms4a6c	membrane-spanning 4-domains, subfamily A, member 6C
5,4	I	2,48	I	2,76	I	Socs1	suppressor of cytokine signaling 1
3,23	I	1,74	I	1,67	I	Tyrobp	TYRO protein tyrosine kinase binding protein
4,55	I	2,64	NC	1,85	NC	Fpr1	formyl peptide receptor 1
5,67	I	3,95	I	3,57	I	Saa3	serum amyloid A 3
3,25	I	-1,98	NC	1,68	NC	Hcn3	hyperpolarization-activated, cyclic nucleotide-gated K ⁺ 3
3,09	I	3,36	I	3,59	I	Psat1	phosphoserine aminotransferase 1
3,23	I	2,13	I	0,8	NC	Fcgr2b	Fc receptor, IgG, low affinity IIb
3,21	I	1,99	I	1,31	NC	Alox5ap	arachidonate 5-lipoxygenase activating protein
3,39	I	0,18	NC	0,01	NC	Frmd4b	FERM domain containing 4B
5,29	I	2,74	I	0,26	NC	Ifi205 /// Mnda	interferon activated gene 205 /// myeloid cell nuclear differentiation antigen

Tab.B: Entzündungs-assoziierte Genexpression bei Wildtyp BL10 und TLR-defizienten Tieren (Signal log Verhältnis als Decrease < minus 3)

WT BL10 Tag 8p.i. vs naiv Signal log Verhältnis	WT BL10 Tag 8p.i. vs naiv Änderung	TLR2-/- Tag 8p.i. vs naiv Signal log Verhältnis	TLR2-/- Tag 8p.i. vs naiv Änderung	TLR4-/- Tag 8p.i. vs naiv Signal log Verhältnis	TLR4-/- Tag 8p.i. vs naiv Änderung	Gensymbol	Genbezeichnung
-4,52	D	-3,12	D	-0,54	D	Sgpl1	sphingosine phosphate lyase 1
-4,76	D	-3,83	D	0,24	NC	Ilf2	interleukin enhancer binding factor 2
-5,31	D	-4,45	D	0,21	NC	Akap1	A kinase (PRKA) anchor protein 1
-5,06	D	-2,36	NC	-2,4	D	Adcy8	adenylate cyclase 8
-4,71	D	-3,11	D	-0,19	NC	Pklr	pyruvate kinase liver and red blood cell
-4,52	D	-4,64	D	0,06	NC	Clstn1	calsyntenin 1
-4,98	D	-0,35	NC	-0,52	NC	Igfbp4	insulin-like growth factor binding protein 4
-5,76	D	-2,3	D	0,11	NC	Mad	Max dimerization protein
-4,62	D	-1,43	NC	0,04	NC	Tyki	thymidylate kinase family LPS-inducible
-5,34	D	-1,01	NC	-1,53	NC	Met	met proto-oncogene
-4,83	D	-3,28	D	-0,53	NC	Dia1	diaphorase 1 (NADH)
-5,04	D	-2,92	D	-0,04	NC	Gpr108	G protein-coupled receptor 108
-4,57	D	-1,85	D	-0,26	NC	Bcl2l1	Bcl2-like 1
-5,25	D	-3,18	NC	-3,49	D	Cda	Cytidine deaminase
-4,8	D	-3,56	D	-1,19	D	Cyp4f16	cytochrome P450, family 4, subfamily f, polypeptide 16
-5,23	D	-4,09	D	-2,52	D	Pdzk1	PDZ domain containing 1

WT BL10 Tag 8p.i. vs naiv Signal log Verhältnis	WT BL10 Tag 8p.i. vs naiv Änderung	TLR2-/- Tag 8p.i. vs naiv Signal log Verhältnis	TLR2-/- Tag 8p.i. vs naiv Änderung	TLR4-/- Tag 8p.i. vs naiv Signal log Verhältnis	TLR4-/- Tag 8p.i. vs naiv Änderung	Gensymbol	Genbezeichnung
-4,59	D	-4,78	D	-1,66	D	Epha1	Eph receptor A1
-4,92	D	-4,05	D	-0,58	D	Ckmt1	creatine kinase, mitochondrial 1, ubiquitous
-4,84	D	1,21	NC	-1,37	NC	D15Ert405e	DNA segment, Chr 15, ERATO Doi 405, expressed
-4,54	D	-1,85	D	-2,19	D	Arg2	arginase type II
-5,45	D	-3,34	D	0	NC	Lasp1	LIM and SH3 protein 1
-6,68	D	-5,48	D	-2,72	D	Cyp2d26	cytochrome P450, family 2, subfamily d, polypeptide 26
-5	D	-1,32	NC	-0,24	D	Gjb1	gap junction membrane channel protein beta 1
-4,88	D	-3,52	NC	0,38	NC	Retn	resistin
-4,62	D	-4,09	D	-0,17	NC	Atp2a3	ATPase, Ca++ transporting, ubiquitous
-4,75	D	-0,02	NC	-0,4	NC	Hes6	hairy and enhancer of split 6 (Drosophila)
-5,51	D	-2,61	NC	-0,57	NC	ErbB3	V-erb-b2 erythroblastic leukemia viral oncogene homolog 3 (avian)
-4,77	D	-1,9	D	-0,13	NC	P2rx4	purinergic receptor P2X, ligand-gated ion channel 4
-5,62	D	-2,06	D	0,34	NC	Ppil2	peptidylprolyl isomerase (cyclophilin)-like 2
-4,55	D	-1,73	D	-0,39	D	Bsg	basigin
-4,6	D	-2,91	D	-0,03	NC	Car3	carbonic anhydrase 3
-5,77	D	-0,68	D	-0,08	NC	Itga3	integrin alpha 3

Tab. C: TLR4-abhängige entzündungs-assoziierte Expression (Signal log Verhältnis >1,5;< minus 3)

WT BL10 Tag 8p.i. vs naiv Signal log Verhältnis	TLR2-/- Tag 8p.i. vs naiv Signal log Verhältnis	TLR4-/- Tag 8p.i. vs naiv Signal log Verhältnis	Gensymbol	Genbezeichnung
NC		I		
0,99	0,09	1,94	Xrcc1	X-ray repair complementing defective repair in Chinese hamster cells 1
1,83	1,79	2,16	Ctla2b /// Ctla2a	cytotoxic T lymphocyte-associated protein 2 beta/alpha
-0,13	-0,18	1,98	Angptl4	angiopoietin-like 4
1,29	0,14	1,58	Rad51	RAD51 homolog (S. cerevisiae)
2,2	1,34	3,08	Nfil3	nuclear factor, interleukin 3, regulated
2,31	0,06	3,64	Gdf15	growth differentiation factor 15
-0,53	2,33	3,26	Sost	sclerostin
1,26	-1,65	2,89	Pik3c2g	phosphatidylinositol 3-kinase, C2 domain containing, gamma polypeptide
0,39	0,5	3,08	Pparbp	peroxisome proliferator activated receptor binding protein
-4,08	0,97	4,46	Klr1d	killer cell lectin-like receptor subfamily B member 1D
2,13	3,06	5,07	Ttyh1	tweety homolog 1 (Drosophila)
0,61	0,18	3,61	D2Erd750e	DNA segment, Chr 2, ERATO Doi 750, expressed
0,76	0,14	2,71	Wars	tryptophanyl-tRNA synthetase
-2,45	-0,23	2,25	Kcnk3	potassium channel, subfamily K, member 3
-3,07	-2,76	3,35	Slc25a30	solute carrier family 25, member 30
1,28	-1,55	2,68	Mgat2	mannoside acetylglucosaminyltransferase 2
0,02	0,51	2,97	Phgdh	3-phosphoglycerate dehydrogenase

WT BL10 Tag 8p.i. vs aiv Signal log Verhältnis	TLR2-/- Tag 8p.i. vs naiv Signal log Verhältnis	TLR4-/- Tag 8p.i. vs naiv Signal log Verhältnis	Gensymbol	Genbezeichnung
NC		I		
0,2	-0,72	2,35	Myh1	Myosin, heavy polypeptide 1, skeletal muscle, adult
2,02	1,09	2,01	Ccr12	chemokine (C-C motif) receptor-like 2
-2,49	-4,04	1,82	Hspa9a	heat shock protein, A
-0,21	-1,61	3,96	Hmgcs2	3-hydroxy-3-methylglutaryl-Coenzyme A synthase 2
-0,59	-0,36	3,22	Gpt2	glutamic pyruvate transaminase (alanine aminotransferase) 2
-1,18	-0,15	2,13	Fkbp5	FK506 binding protein 5
0,79	-0,01	1,66	Gpx3	glutathione peroxidase 3
1,55	-2,15	3,95	Zfp90	zinc finger protein 90
-0,69	-2,54	3,08	Pacs1n1	protein kinase C and casein kinase substrate in neurons 1
0,71	-1,56	2,87	Fut2	fucosyltransferase 2
2,13	-1,33	2,65	Stat5a	signal transducer and activator of transcription 5A
-1,68	-1,48	1,61	Egfl7	EGF-like domain 7
0,08	0,74	3,08	Kcnq2	potassium voltage-gated channel, subfamily Q, member 2
-1,74	-1,34	1,76	Tcf2a	transcription factor E2a
0,49	1,37	2,5	Xlkd1	extra cellular link domain-containing 1
-2,21	0,48	4,13	Ttr	transthyretin

WT BL10 Tag 8p.i. vs naiv Signal log Verhältnis	TLR2-/- Tag 8p.i. vs naiv Signal log Verhältnis	TLR4-/- Tag 8p.i. vs naiv Signal log Verhältnis	Gensymbol	Genbezeichnung
NC		D		
-1,65	1,2	-3,15	Reg1	regenerating islet-derived 1
1,77	0,2	-4,24	Pou2af1	POU domain, class 2, associating factor 1
0,69	1,52	-5,73	Mmp13	matrix metalloproteinase 13
0,8	1,33	-3,46	Cyp46a1	cytochrome P450, family 46, subfamily a, polypeptide 1
0,35	0,35	-4,2	2310058J06Rik	RIKEN cDNA 2310058J06 gene
0,49	-0,37	-3,78	Tcfap4	transcription factor AP4
-2,88	-2,61	-3,83	Cfi	complement component factor i
0,35	-0,63	-3,22	Pcnx	pecanex homolog (Drosophila)
-2,23	-1,89	-3,15	Accn5	amiloride-sensitive cation channel 5, intestinal
-0,49	-2,56	-4,08	Hapln2	hyaluronan and proteoglycan link protein 2
-0,24	-3,47	-3,47	Nrg3	neuregulin 3
1,57	-0,76	-3,21	Prlr	prolactin receptor
4,19	1,32	-5,1	Alox12	arachidonate 12-lipoxygenase
2,92	-0,63	-3,27	Tb1xr1	transducin (beta)-like 1X-linked receptor 1
1,28	-3,64	-4,51	Emcn	endomucin

WT BL10 Tag 8p.i. vs naiv Signal log Verhältnis	TLR2-/- Tag 8p.i. vs naiv Signal log Verhältnis	TLR4-/- Tag 8p.i. vs naiv Signal log Verhältnis	Gensymbol	Genbezeichnung
NC		D		
0,14	1,03	-4,15	Zranb1	zinc finger, RAN-binding domain containing 1
0,14	-1,04	-3,36	Itgb1	integrin beta 1 (fibronectin receptor beta)
1,03	0,11	-4,1	Sh3bgr1	SH3-binding domain glutamic acid-rich protein like
-0,13	0,36	-3,53	Tnfrsf11a	tumor necrosis factor receptor superfamily, member 11a
1,28	2,43	-3,62	Gmfb	glia maturation factor, beta
0,21	1,05	-3,56	Cpeb2	cytoplasmic polyadenylation element binding protein 2
0,65	-0,12	-3,75	Sh3bgr1	SH3-binding domain glutamic acid-rich protein like
0,43	-0,04	-3,6	Slc2a3	solute carrier family 2 (facilitated glucose transporter), member 3
0,45	-1,33	-3,91	Pcolce	procollagen C-proteinase enhancer protein
0,13	-0,22	-3,48	Ltbp3	latent transforming growth factor beta binding protein 3
-2,81	-1,7	-3,98	Habp2	hyaluronic acid binding protein 2
-1,07	-0,05	-4,57	Slc16a7	solute carrier family 16 (monocarboxylic acid transporters), member 7
1,8	-1,01	-5,05	Asph	aspartate-beta-hydroxylase
0,34	-0,23	-4,29	Fshb	follicle stimulating hormone beta
-2,51	2,58	-3,92	Mtac2d1	membrane targeting (tandem) C2 domain containing 1
1,11	2,05	-3,38	Cd80	CD80 antigen
1,83	-3,69	-3,85	Stk31	serine threonine kinase 31
-0,44	0,07	-4,53	Bace1	beta-site APP cleaving enzyme 1
-2,84	-1,18	-3,12	Pik4ca	phosphatidylinositol 4-kinase, catalytic, alpha polypeptide

WT BL10 Tag 8p.i. vs naiv Signal log Verhältnis	TLR2-/- Tag 8p.i. vs naiv Signal log Verhältnis	TLR4-/- Tag 8p.i. vs naiv Signal log Verhältnis	Gensymbol	Genbezeichnung
NC			D	
-3,07	-2,33	-3,1	Asah2	N-acylsphingosine amidohydrolase 2
-1,88	0,2	-3,17	Kcnq2	potassium voltage-gated channel, subfamily Q, member 2
1,04	-2,74	-4,43	Gnaz	guanine nucleotide binding protein, alpha z subunit
-1,05	-1,13	-3,89	Scara3	scavenger receptor class A, member 3
-1,07	-0,05	-4,57	Slc16a7	solute carrier family 16 (monocarboxylic acid transporters), member 7
1,8	-1,01	-5,05	Asph	aspartate-beta-hydroxylase
0,34	-0,23	-4,29	Fshb	follicle stimulating hormone beta

PCR-Protokolle zur Genotypisierung

Tab. D: PCR-Protokoll für die TLR2^{-/-} Typisierung

TLR2 <i>-/-</i> Wildtyp			25mM	10mM	20mg/ml	Primer 1	Primer 2		
	H2O	10x Buffer	MgCl2	dNTP	BSA	TLR 2-1	TLR 2-2	AmpliTag	Template
µl	17,5	2,5	2,5	0,5	0,25	0,25	0,25	0,25	1
	Initial	Denaturierung	Annealing	Elongation	Endelongation	Kühlen	Erwartetes Produkt: 500 bp		
°C	95	94	67	72	74	4	2% Agarose Gel		
sec/min	120	30	60	60	10 min	xx	100bp Ladder		
Zyklen		35							
TLR2 <i>-/-</i> Mutantes Allel			25mM	10mM	20mg/ml	Primer 1	Primer 2		
	H2O	10x Buffer	MgCl2	dNTP	BSA	TLR 2-1	TLR 2-3	AmpliTag	Template
µl	17,5	2,5	2,5	0,5	0,25	0,25	0,25	0,25	1
	Initial	Denaturierung	Annealing	Elongation	Endelongation	Kühlen	Erwartetes Produkt: 300 bp		
°C	95	94	67	72	74	4	3% Agarose Gel		
sec/min	120	30	60	60	10 min	xx	50bp Ladder		
Zyklen		35							

Tab. E: PCR-Protokoll für die TLR4^{-/-} Typisierung

TLR4 +/- Wildtyp			25mM	10mM	20mg/ml	Primer 1	Primer 2		
	H2O	10x Buffer	MgCl2	dNTP	BSA	TLR4 Ex1 sense	TLR4 Ex1 antisense	AmpliTag	Template
µl	17,5	2,5	2,5	0,5	0,25	0,25	0,25	0,25	1
	Initial	Denaturierung	Annealing	Elongation	Endelongation	Kühlen	Erwartetes Produkt: 400 bp		
°C	94	94	68	72	74	4	3% Agarose Gel		
sec	30	20	1	1	7	xx	100bp Ladder		
Zyklen	35								
TLR4 +/- Mutantes Allel			25mM	10mM	20mg/ml	Primer 1	Primer 2		
	H2O	10x Buffer	MgCl2	dNTP	BSA	TLR 4 Cr sense	TLR 4 Cr antisense	AmpliTag	Template
µl	17,5	2,5	2,5	0,5	0,25	0,25	0,25	0,25	1
	Initial	Denaturierung	Annealing	Elongation	Endelongation	Kühlen	Erwartetes Produkt: 140 bp		
°C	94	94	50	72	74	4	3% Agarose Gel		
sec	30	20	1	1	7	xx	50bp Ladder		
Zyklen	35								

Tab. F: PCR-Protokoll für die LBP^{-/-} Typisierung

LBP ^{-/-} Wildtyp			25mM	10mM	20mg/ml	Primer 1	Primer 2		
	H2O	10x Buffer	MgCl ₂	dNTP	BSA	LBP-f	LBP-r	AmpliTa _q	Template
µl	17,5	2,5	2,5	0,5	0,25	0,25	0,25	0,25	1
	Initial	Denaturierung	Annealing	Elongation	Endelongation	Kühlen	Erwartetes Produkt: 195 bp		
°C	94	94	61	72	72	4	1.6 % Agarose Gel		
sec/min	120	30	30	30	2 min	xx	50bp Ladder		
Zyklen			33						
LBP ^{-/-} Mutantes Allel			25mM	10mM	20mg/ml	Primer 1	Primer 2		
	H2O	10x Buffer	MgCl ₂	dNTP	BSA	LBP-f	neo5	AmpliTa _q	Template
µl	17,5	2,5	2,5	0,5	0,25	0,25	0,25	0,25	1
	Initial	Denaturierung	Annealing	Elongation	Endelongation	Kühlen	Erwartetes Produkt: 465 bp		
°C	95	94	50	72	74	4	1.6 % Agarose Gel		
sec/min	120	30	60	60	10 min	xx	100bp Ladder		
Zyklen			33						

Tab. G: Primer für die Genotypisierung der Knockoutzustände

Primerbezeichnung	Sequenz
TLR4 Exon1 sense	CAGTCGGTCAGCAAACGCCTTCTTC
TLR4 Exon1 antisense	CAAGGCAGGCTAGCAGGAAAGGGTG
TLR4 CR sense	GCAAGTTTCTATATGCATTCTC
TLR4 CR antisense	CCTCCATTTCCAATAGGTAG
TLR 2-1	CTTCCTGAATTTGTCCAGTACAGGG
TLR 2-2	TCGACCTCGATCAACAGGAGAAGGG
TLR 2-3	GGGCCAGCTCATTCCTCCCACTCAT
LBP-f	AGAGGCATGGTGGCCAGA
LBP-r	CCCACTCCTGGGCTTTGT
Neo5	GCCGATTGTCTGTTGTGCCC

Abkürzungsverzeichnis

Kürzel	Bezeichnung
°C	Grad Celsius
μ	Micro
A	Adenosin
APS	Ammoniumperoxodisulfat
Aqua dest	Destilliertes Wasser
ATCC	American type collection center
ATP	Adenosintriphosphat
Bp	Basenpaare
BSA	Bovines Serum Albumin
C	Cytosin
CED	Chronisch entzündliche Darmerkrankungen
ColB	Columbia Schafblut Agar
CSPD	Dinatrium-3-(4-methoxyspiro{1,2-doxetan-3,2'(5'chloro)tricyclo[3.3.1.1 ^{3,7}] decan}-4-yl)-phenylphosphat
DF	David Fuchs
DGGE	Denaturierende Gradienten Gel Elektrophorese
DIG	Digoxigenin
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribosenukleinsäure
dNTP	Nukleotidtriphosphat
DSMZ	Deutsche Stammsammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
FISH	Fluoreszenz in situ Hybridisierung
F	Engl.: Forward (vorwärts)
R	Engl.: Reverse (rückwärts)
G	Guanosin
GvHD	(engl.) Graft versus Host Disease ; Transplantatabstoßungserkrankung
q	Erdbeschleunigung
qr	Gramm
IEL	Intraepitheliale Lymphozyten
IFN	Interferon
IL	Interleukin
IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid
JN	Julia Niebergall
KO	Knock out
L	Liter
LB	Luria Bertani
LP	Lamina propria
M	Molar
MALT	Mucosa-associated lymphoid tissue lymphoma
MD-2	Engl.: myeloid differentiation protein
mq	Milligramm

mm	Millimeter
MMH	Markus M. Heimesaat
MW	Michaela Wattrodt
OTU	Operative taxonomic unit
PEA	Phenyethylalkohol
PBS	Phosphat gepufferte Salzlösung
PCR	Polymerase Kettenreaktion
RAPD	Random amplified polymorphic DNA
RNA	Ribonukleinsäure
rRNA	Ribosomale Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumdodecylsulfat
T	Thymin
TAE	Tris-acetat-EDTA
TBE	Tris-borat-EDTA
TCA	Trichloressigsäure
TE	Tris-ethylendiamintetra Essigsäure
TEMED	N,N,N,N-Tetramethylethylendiamin
TLR	Engl.: Toll like receptor
TMB	(3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin)
TNF	Tumor Nekrose Faktor
Treg	Regulatorische T-Zellen
U	Unit
Tollip	Engl.: toll interacting protein
v/v	vol/vol
X-Gal	5- Bromo-4-Chloro-3-Indoyl-B-D- Galactopyranosid

Publikationsliste

Veröffentlichungen dieser Arbeit

- Aebischer, T., Fischer, A., Walduck, A., Schlötelburg, C., Lindig, M., Schreiber, S., Meyer, T.F., Bereswill, S., Göbel, U.B. (2006). Vaccination prevents *Helicobacter pylori* induced alterations of the gastric flora in mice. FEMS Immunology and Medical Microbiology 46(2):221-229.
- Heimesaat, M.M., Bereswill, S., Fischer, A., Fuchs, D., Niebergall, J., Jahn, H.K., Dunay, I.R., Moter, A., Gescher, D.M., Hahn, H., Schumann, R.R., Göbel, U.B., Liesenfeld, O. (2006). Gram-negative bacteria aggravate murine small Intestinal Th1-type Immunopathology following oral Infection with *Toxoplasma gondii*. Journal of Immunology 177 (12): 8785-8795.
- Heimesaat, M.M., Fischer, A., Jahn, H.K., Niebergall, J., Freudenberg, M., Blaut, M., Liesenfeld, O., Schumann, R.R., Göbel, U.B., Bereswill, S. (2007). Exacerbation of Murine Ileitis By Toll-Like Receptor 4 Mediated Sensing of Lipopolysaccharide From Commensal *Escherichia coli*. Gut 56 (7):941-948.
- Heimesaat, M.M., Fischer, A., Siegmund, B., Kupz A., Niebergall J., Fuchs D., Jahn H.K., Freudenberg, M., Loddenkemper, C., Batra, A., Lehr, H.A., Liesenfeld, O., Blaut, M., Göbel, U.B., Schumann, R.R., Bereswill, S. (2007). Shift towards pro-inflammatory bacteria aggravates acute murine colitis via toll-like receptors 2 and 4. PloS ONE; (2):e662.

Frühere Veröffentlichungen

- Steidle, J.L.M. & Fischer, A. (2000). Quantity Does Matter: How Feces Are Used for Host Stage Selection by Granary Weevil Parasitoid *Lariophagus distinguendus*. Journal of Chemical Ecology 26 (12):2657-2664.
- Fischer, A. & Steidle, J.L.M. (2001). Wirtserkennungsreize für den Kornkäferparasitoiden *Lariophagus distinguendus* FÖRSTER (Hymenoptera: Pteromalidae) und die Bedeutung von induzierten Pflanzenchemikalien. Mitteilungen der Deutschen Gesellschaft für allgemeine und angewandte Entomologie, Band 13:37.
- Steidle, J.L.M., Fischer, A., Gantert, C. (2005). Do grains whisper for help? Evidence for herbivore-induced synomones in wheat grains. Entomologia Experimentalis et Applicata 115:239-245.

Poster

M.M.Heimesaat, A.Fischer, D.Fuchs, I.R.Dunay, S.Bereswill, U.B.Göbel, H.Hahn, O.Liesenfeld, 56. Jahrestagung der DGHM-Tagung (2004). The impact of small intestinal bacterial flora on the development of Th1-type immunopathology following peroral infection of mice with *Toxoplasma gondii*. Int. J. Med.Microbiol. 294 (suppl.39), p202

O.Goldenberg, B.Graf, S.Herrmann, T.Adam, G.Marjoram, A.Fischer, G.Hong, S.Bereswill, U.B.Göbel, 15th ECCMID (2005). Rapid Molecular Detection of Clinically Relevant Yeasts by PCR-based Denaturing High Performance Liquid Chromatography. Clinical Microbiology and Infection; Vol 11 s2

M.M.Heimesaat, A.Fischer, D.Fuchs, J.Niebergall, O.Goldenberg, H.K.Jahn, I.R.Dunay, R.R.Schumann, A.Moter, D.M.Gescher, H.Hahn, U.B. Göbel, S.Bereswill, O.Liesenfeld. 15th ECCMID (2005). Gramnegative Intestinal Bacteria Contribute to Immunopathology of *Toxoplasma gondii*-Induced Ileitis in Mice. Clinical Microbiology and Infection; Vol 11 s2

M.M.Heimesaat, A.Fischer, J.Niebergall, H.K.Jahn, M.Freudenberg, O.Liesenfeld, U.B.Göbel, R.R.Schumann, S.Bereswill (2005). 57. Jahrestagung der DGHM-Tagung. Gut Bacteria Aggravate Small Intestinal Inflammation Via Toll-like Receptor 4.

K.Rieger, O.Goldenberg, A.Fischer, H.Troeger, J.D. Schulzke, T.Fietz, A.Muessig, C.Gentilini, D.Sommer, K.Freyberg, E.Thiel, U.B.Göbel, L.Uharek (2005). Patients with GvHD demonstrate an impaired epithelial barrier function and a significant reduction in the bacterial diversity suggesting a role of the intestinal microflora in the pathogenesis of the disease. Bone Marrow Transplantation 35: S142-S142 Suppl. 2

M.M.Heimesaat, A.Fischer, H.K.Jahn, J.Niebergall, M.Freudenberg, M.Blaut, O.Liesenfeld, R.R.Schumann, U.B.Göbel, S.Bereswill (2006). Role of MyD88 and TRIF in the exacerbation of murine ileitis by TLR4-mediated sensing of LPS from commensal *Escherichia coli*. 3. Expertenworkshop Inflammation UCB, Murnau

M.M.Heimesaat, A.Fischer, D.Fuchs, J.Niebergall, A.Kupz, C.Loddenkemper, H.K.Jahn, B.Siegmund, M.Freudenberg, O.Liesenfeld, U.B.Göbel, R.R.Schumann, S.Bereswill (2006). Toll-like-receptors 2/4 And LPS-Binding Protein Trigger Abundance of *Escherichia coli* in Acute Murine DSS-Colitis. 3. Expertenworkshop Inflammation UCB, Murnau

Danksagung

Mein erster Dank gilt Herrn Prof. Dr. Dr. Ulf Göbel für die freundliche Aufnahme in seine Arbeitsgruppe und für die Möglichkeit zur Erstellung dieser Promotion. Viel Zeit für meine Einarbeitung in die Molekularbiologie haben Frau Dr. Annette Moter, Dr. Cord Schlötelburg und Vesna Haban aufgebracht, denen ich hier auch ausdrücklich danken möchte. Herzlichen Dank auch an Dr. Toni Aebischer und Prof. Dr. T.F. Meyer (MPI für Infektionsbiologie, Berlin) für die Möglichkeit zur Arbeit am *Helicobacter*-Modell. Herrn Prof. Dr. M. Blaut (DIFE-GAMI und Max-Rubner-Labor) ermöglichte mir Einblicke in die Gnotobiotik, wofür ich ihm danken möchte. Meinen herzlichsten Dank verdienen meine beiden geschätzten Kollegen und Freunde, PD Dr. Stefan Bereswill und Dr. Markus Heimesaat. Mit grösster Hochachtung vor ihrem persönlichen Einsatz und mit voller Dankbarkeit für ihre geleistete Arbeit in den gemeinsamen Forschungsprojekten, wie auch für die Anleitung zum wissenschaftlichen Denken und Schreiben, sowie für den freundschaftlichen Rückhalt, habt Dank ! Den beiden Medizinstudenten David Fuchs und Julia Niebergall danke ich herzlich für die fruchtbare Zusammenarbeit. Dank auch an Prof. Dr. Oliver Liesenfeld und alle Mitarbeiter seiner Arbeitsgruppe und allen Tierpflegerkräften im FEM für die gute Zusammenarbeit. Unserem technischen „Super“-Assistenten Gernot Reifenberger gebührt an dieser Stelle ein grosses Lob und Dank für seine Umsicht im Labor, seine enorme Arbeitsleistung und für sein persönliches Engagement bei der Betreuung von Praktikanten. Prof. Dr. Ralf Schumann möchte ich für seine grosszügige Unterstützung danken und seiner Arbeitsgruppe, besonders Fränzi Creutzburg, Diana Wöllner, Jana Eckert, Dr. Djin-Ye Oh und Dr. Janine Zweigner für ihre fachliche und persönliche Hilfe. Herzlich dankbar bin ich der gesamten Belegschaft der „ehemaligen“ Diagnostik in Mitte und ganz besonders Frau PD Dr. Elke Halle. Das gilt auch für die Mitarbeiterinnen der Molekulardiagnostik, Tina Fiedler, Angela Pohlisch, Annett Petrich und Dr. Britta Schweickert. Meinen Mitstreitern auf dem Weg zur Promotion, Oliver Goldenberg, Hannah-Katharina Jahn und Stefanie Herrmann und besonders Beatrice Leip danke ich für die gemeinsame Arbeit und die schöne Zeit. Der Sonnenfeld-Stiftung vertreten durch Herrn Prof. Dr.-Ing. Hansjürgen Freiherr von Villiez danke ich für die finanzielle Unterstützung und die angenehme persönliche Betreuung !

Meiner Familie danke ich für ihre Geduld und jahrelange Unterstützung besonders in schweren Zeiten.